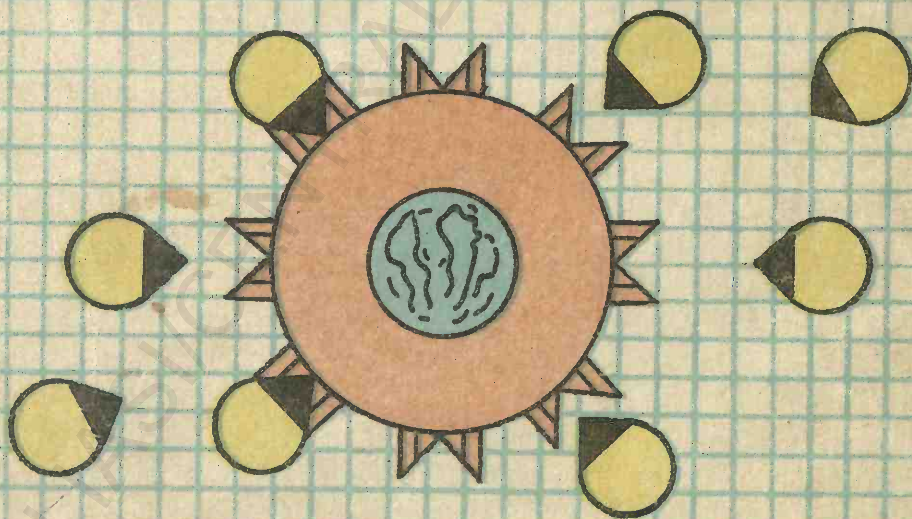
A. VONICA

BIOCHIMIE
APLICAȚII CLINICE



DACIA

PREFAȚĂ

Patologia biochimică a înregistrat mari progrese în ultimii zece ani, iar aceste achiziții au fost relativ rapid asimilate de către laboratoarele clinice.

Așa, de exemplu, progresele imunochimiei permit astăzi dozarea relativ ușoară și deosebit de precisă a fiecărei din cele peste 90 de proteine plasmatice. Metodele imunochimice și electroforeza în gel de poliacrilamidă fac, de asemenea, posibile detectarea și chiar dozarea apolipoproteinelor (componente proteice ale lipoproteinelor). Este important de arătat însă că laboratoarele clinice nu s-au limitat doar la preluarea și aplicarea în practică a metodelor și datelor furnizate de cercetările cu caracter fundamental, ci au contribuit în mod efectiv la dezvoltarea cunoștințelor teoretice din domeniul patologiei. De fapt, prin confruntarea manifestărilor clinice cu datele de laborator care relevau anomalii marcate ale anumitor componente ale plasmei (de exemplu, antitripsina, transferina, apolipoproteina E etc.) s-au putut trage concluzii valabile asupra semnificației funcționale a respectivelor proteine sau apolipoproteine. Amintim aici că descoperirea receptorilor celulari responsabili de captarea și metabolizarea lipoproteinelor (premiul Nobel pentru medicină pe 1985) a pornit de la studiul clinic și de laborator al subiecților cu hipercolesterolemie familială. Ne putem, de asemenea, imagina perspectivele pe care le deschid intervențiile chirurgicale de tipul transplantului de ficat pentru elucidarea, în condiții experimentale, a rolului jucat de acest organ în economia proteinelor și lipoproteinelor plasmatice la om. Un alt domeniu în care studiile clinice și de laborator au adus contribuții cu caracter fundamental este acela al inducerii de enzime sub acțiunea medicamentelor și în genere a substanțelor străine organismului (xenobiotice). Apare astfel din ce în ce mai clar că biochimia clinică poate și trebuie să contribuie nu numai la stabilirea diagnosticului și la evaluarea eficacității terapiei, dar și la elucidarea mecanismelor patogenice. De fapt, în stadiul actual de dezvoltare a științei, clinica nu se mai poate limita la aspectele de conjunctură bazate pe analogii și statistici, ci trebuie să meargă spre o medicină a certitudinii în care manifestările clinice își găsesc o explicație verificabilă experimental și care totodată este în măsură să stabilească natura defectului molecular care stă la baza îmbolnăvirii.

Acestea sînt motivele pentru care în materialul de față am insistat asupra mecanismelor prin care se ajunge la modificările biochimice cu rol diagnostic. După părerea noastră înțelegerea valorii diagnostice și

a limitelor unui test de laborator implică în mod necesar cunoașterea mecanismelor amintite.

În literatura de specialitate s-a introdus nomenclatura SI (sistem internațional) care va înlocui progresiv exprimarea c/g/s). Conform acestei nomenclaturi, colesterolul, trigliceridele, ureea, glucoza etc. nu se mai exprimă ca mg/dl ci ca mmoli/l sau μmoli/l. Există de asemenea tendința, încă controversată, de a exprima activitățile enzimatice în micro- sau nanokatali. În materialul prezentat în acest volum am folosit ambele forme de exprimare și am indicat totodată coeficienții de transformare din mg/dl în mmol/l, în dorința de a accelera însușirea formei de exprimare SI de către clinicieni și de către personalul laboratoarelor.

În alegerea capitolelor care alcătuiesc acest prim volum am pornit de la frecvența cu care sînt solicitate laboratorului diversele analize biochimice și bineînțeles în funcție de interesul autorilor pentru anumite probleme de patologie și implicit de experiența lar personală în respectivele domenii.

Alături de schemele clasice preluate din literatura de specialitate, am căutat să ilustrăm materialul cu observații proprii obținute din practica de zi cu zi a laboratorului Clinicii Medicale I din Cluj-Napoca. De altfel, discuțiile purtate cu colegii din secția clinică au contribuit în mare măsură la redactarea diverselor capitole.

Aducem pe această cale mulțumiri tuturor celor care ne-au ajutat la ducerea la bun sfîrșit a acestui prim volum și sîntem în special recunoscători Editurii Dacia de care ne leagă o veche și fructuoasă colaborare.

Prof. Dr. docent M. CUCUIANU

CUPRINS

I. HIPERLIPOPROTEINEMIILE ŞI ATEROSCLEROZA

1.1. ARGUMENTE PENTRU TEORIA METABOLICĂ A ATEROSCLEROZEI

Concepţia după care anumite anomalii ale lipoproteinelor plasmatice se însoţesc de acumulare de esteri de colesterol şi de alte lipide în ţesutul conjunctiv al pereţilor arteriali şi implicit la dezvoltarea precoce a cardiopatiei ischemice este susţinută astăzi de o serie de argumente de ordin experimental, de ordin epidemiologic precum şi de numeroase observaţii clinice şi de laborator.

Pe plan experimental s-a arătat că un regim bogat în colesterol produce o încărcare cu lipide a pereţilor aortei la animalele studiate. Primele experimente de acest fel au fost efectuate pe iepure, erbivor care nu consumă în mod obişnuit colesterol. Administrînd iepurelui per os mari cantităţi din acest lipoid se ajunge la acumulări de colesterol nu numai în artere ci şi în vezica biliară şi în macrofagele din ganglionii limfatici, ficat şi splină. S-a ridicat astfel întrebarea dacă o astfel de tezaurismoză colesterolică poate prezenta o analogie cu fenomenul de aterogeneză întîlnit la om.

Cercetări ulterioare, efectuate prin încărcări alimentare cronice de lipide şi colesterol la porcul miniatural şi la maimuţele superioare, au reprodus însă leziuni aterosclerotice foarte asemănătoare cu cele întîlnite la om, observîndu-se chiar aspecte care sugerau infarctul miocardic (22).

Studiile experimentale au evidenţiat şi posibilitatea apariţiei unei hiperlipoproteinemii (hipercolesterolemii) spontane, în lipsa oricărei încărcării alimentare, la iepurii care prezentau un anumit defect în procesul de metabolizare a lipoproteinelor (20). Astfel de mutaţii, generînd apariţia unor hiperlipoproteinemii şi a unei ateroscleroze consecutive la animale de experienţă, au o importanţă deosebită pentru studierea mecanismelor care duc la perturbarea metabolismului lipoproteinelor şi la dezvoltarea ulterioară a leziunilor aterosclerotice ale vaselor.

Pe plan epidemiologic s-a arătat că incidenţa aterosclerozei şi mortalitatea prin infarct miocardic sînt mai ridicate în ţările puternic industrializate, unde şi nivelul colesterolemic este crescut. Între ţările cu o incidenţă deosebit de ridicată a aterosclerozei se numără Finlanda, Suedia, RFG, SUA, în timp ce mortalitatea prin infarct miocardic este mult redusă în ţări ca Vietnamul, Coreea sau unele ţări în curs de dezvoltare din Africa sau America Latină (47).

Anchetele alimentare au fost în măsură să precizeze că procentul de lipide saturate, de origine animală, și de colesterol din rația finlandezilor, suedezilor și americanilor este mult mai ridicat decît în cazul regimului alimentar al vietnamezilor sau al coreenilor (3,47).

Nu trebuie uitat însă că cele două grupe de populație amintite mai sus diferă nu numai în privința tipului de alimentație dar și sub alte aspecte ale modului de viață ca de exemplu sedentarismul sau stările de încordare psihoemoțională impuse de situațiile competitive din societățile moderne. S-a ridicat și problema unor particularități geografice sau rasiale avîndu-se în vedere marile deosebiri între diversele populații urmărite.

O contribuție importantă la elucidarea acestor aspecte a fost adusă de cercetări efectuate în regiunea Clujului, investigîndu-se rația alimentară, colesterolemia și incidența manifestărilor clinice ale aterosclerozei la locuitorii de aceeași rasă din două comune învecinate asemănătoare sub aspect geografic. Într-una din comune, Finișel, rația alimentară a locuitorilor însuma 3000 calorii din care 25% era reprezentată de lipide iar nivelul mediu al colesterolemiei era 160 mg/dl (la bărbații între 50—59 de ani), pe cînd în cealaltă comună (Vlaha), valoarea energetică a alimentelor ingerate era de 4100 calorii, din care 38% lipide, iar colesterolemia medie la aceeași grupă de vîrstă și sex se situa la 188 mg/dl. Ceea ce este deosebit de interesant este însă faptul că incidența bolilor cardiovasculare a fost mai mult decît dublă la populația care se alimenta cu un regim bogat în lipide și avînd un nivel mai ridicat al colesterolemiei (34, 35).

Poate că cel mai puternic argument în favoarea teoriei metabolice a aterosclerozei este reprezentat însă de observațiile prospective de lungă durată care urmăresc apariția manifestărilor clinice de ateroscleroză la subiecții care inițial erau aparent sănătoși. Bine cunoscutul studiu de la Framingham a demonstrat astfel în decurs de 5 ani o incidență de patru ori mai mare a infarctului miocardic la subiecții cu nivelul colesterolului peste 270 mg/dl, față de cei care aveau colesterolemie sub 200 mg/dl (27).

Studii clinice și de laborator au arătat că leziunile aterosclerotice survin frecvent în afecțiuni care se însoțesc adeseori de o importantă creștere a colesterolemiei. Astfel de afecțiuni sînt sindromul nefrotic, diabetul zaharat și hipotiroidismul. Este important de menționat că hipercolesterolemia familială se asociază în marea majoritate a cazurilor cu o ateroscleroză severă și precoce astfel încît homozigoții pentru această anomalie ajung la deces prin infarct miocardic înaintea vîrstei de 30 de ani (34, 35, 45).

Observațiile clinice au mai arătat că o bună parte a bolnavilor cu cardiopatie ischemică prezintă un nivel mai crescut al lipidelor serice față de subiecții sănătoși de aceeași vîrstă. Există însă și numeroase neconcordanțe între datele clinice și cele de laborator; se pot astfel întîlni *persoane clinic sănătoase care prezintă hiperlipemie*. În lumina studiilor prospective (longitudinale) menționate anterior, astfel de persoane pot fi considerate ca fiind predispuse la ateroscleroză, aflîndu-se într-un stadiu inițial al acestei boli sau în orice caz prezentînd un important factor de risc. Așa cum se va vedea în cele ce urmează,

există însă și anumite tipuri de hiperlipemii care nu se asociază frecvent cu ateroscleroza.

Se constată și *cazuri de ateroscleroză clinic manifestă care nu prezintă hiperlipemie*. Se admit mai multe explicații ale unor astfel de situații. Așa, de exemplu, la bărbații vîrstnici (peste 65 de ani), nivelul lipidelor serice tinde adeseori să scadă existînd astfel posibilitatea ca leziunile aterosclerotice, instalate într-o perioadă anterioară, să se manifeste clinic la o vîrstă înaintată, cînd alterările spectrului lipidic se atenuează. O altă explicație o poate constitui evoluția fazică a modificărilor lipidice, perturbarea metabolismului acestora evoluînd în puseuri care de multe ori coincid cu creșteri ale valorilor tensionale sau cu oscilații ponderale și care în unele cazuri pot fi puse în legătură cu stări de încordare psihoemoțională. O a treia explicație a acestor discordanțe o constituie scăderea lipoproteinelor serice în zilele următoare unui infarct miocardic, care produce o stare de șoc cu o congestie consecutivă a ficatului și scăderea capacității de sinteză hepatică a lipoproteinelor. Nu trebuie uitat apoi că arteriopatiile pot fi de natură inflamatorie (ricketsiană, reumatică) și că în aceste cazuri nivelul lipidelor serice poate fi normal. Pe de altă parte, fumatul, hipertensiunea arterială și puseele inflamator alergice, evoluînd cu complexe imune circulante, pot contribui la dezvoltarea leziunilor aterosclerotice ale vaselor chiar și în lipsa unei hiperlipoproteinemii importante. De altfel, așa cum se va vedea pe parcurs (vezi pag. 75), legătura dintre hiperlipemie și leziunile aterosclerotice depinde și de anumite particularități ale structurii lipoproteice (lipoproteinele mai bogate în apolipoproteină B sînt mai aterogene), de raportul dintre lipoproteinele cu densitate joasă (LDL) și cele cu densitate mare (HDL) (de fapt raportul apolipoproteină B/apolipoproteină A), precum și de reactivitatea endoteliilor, macrofagelor, probabil și a altor celule implicate local.

Cu toate rezervele amintite, se poate afirma că determinările de lipide și lipoproteine serice sînt de un real folos practic pentru depistarea subiecților cu risc major de a dezvolta ateroscleroza precoce a coronarelor precum și pentru precizarea naturii aterosclerotice a unei arteriopatii.

Argumentelor prezentate li se adaugă și observațiile recente (48) după care aplicarea în anumite comunități a unor măsuri igienodietetice (respectiv reducerea consumului de grăsimi saturate și de colesterol din alimentație) au reușit să reducă substanțial mortalitatea și morbiditatea cauzată de afectarea aterosclerotică a vaselor (vezi pag. 67).

Sînt deci explicabile atît interesul deosebit arătat în literatura medicală pentru studiul lipoproteinelor cît și marile progrese realizate în domeniul fiziopatologiei metabolismului lipidic.

I.2. METABOLISMUL LIPOPROTEINELOR ȘI TRANSPORTUL PLASMATIC AL LIPIDELOR

Principalele achiziții ale ultimilor ani privind metabolismul lipoproteinelor se referă mai ales la natura și semnificația funcțională a apoproteinelor, componentele proteice ale lipoproteinelor precum și la

receptorii celulari responsabili de captarea, internalizarea și degradarea intracelulară a lipoproteinelor.

Aceste descoperiri au permis o aprofundare a mecanismelor prin care se ajunge la creșterea diferitelor clase de lipoproteine și implicit la o reconsiderare pe baze fiziopatologice a clasificării hiperlipoproteinemiilor în anumite tipuri.

I.2.1. STRUCTURA LIPOPROTEINELOR. DIVERSE CLASE DE LIPOPROTEINE

Lipidele sînt menținute în mediul apos al plasmei datorită formării unor complexe cu anumite grupări proteice cunoscute sub denumirea de apolipoproteine sau apoproteine. Aceste complexe — lipoproteinele — sînt de regulă particule sferice avînd la suprafața lor molecule cu grupări polare hidrofile respectiv proteine, fosfolipide și colesterol liber — iar în centru trigliceride și esteri de colesterol, care au un caracter hidrofob. Legăturile dintre apoproteine și lipide se datoresc cel puțin în parte proprietății lanțurilor polipeptidice de a forma structuri helicoidale, avînd atît suprafețe hidrofobe (în contact cu miezul lipidic) cît și radicali hidrofili (în contact cu mediul apos). O reprezentare schematică a lipoproteinelor este redată în fig. 1.1.

Deși toate lipoproteinele plasmatice conțin atît proteine cît și colesterol, trigliceride și fosfolipide, ele diferă în privința raportului dintre proteine și lipide, a raportului dintre diferitele componente lipidice precum și în ceea ce privește natura apoproteinelor din compoziția lor. Diferențele de structură se repercută asupra proprietăților fizico-chimice ale lipoproteinelor, ca, de exemplu, densitatea măsurată prin ultracentrifugare sau viteza de migrare electroforetică. De altfel clasificarea lipoproteinelor plasmatice se face tocmai pe baza comportării lor la ultracentrifugare sau la electroforeză (24, 45).

Fig. 1.1. Reprezentare schematică a unei particule de LDL. Schematizare după datele din literatură (7). Se poate vedea că această particulă sferică, cu un diametru de 22 nm, conține în miezul ei esteri de colesterol hidrofobi înveliți de o peliculă de colesterol liber și fosfolipide în care se găsește parțial înglobată o moleculă proteică — apolipoproteina B.

Separarea prin ultracentrifugare se bazează pe faptul că prin acest procedeu, efectuat într-un mediu cu o anumită densitate, unele fracțiuni ale lipoproteinelor, și anume acelea mai

bogate în trigliceride și esteri de colesterol, dar mai sărace în proteine și avînd o densitate mai mică, tind să urce la suprafață (să floteze).

Viteza de flotare a lipoproteinelor poate fi exprimată în unități Svedberg de flotație, fiecărei clase corespunzîndu-i un anumit coeficient de flotație (S_f) (1 Svedberg fiind egal cu 10^{-13} cm/s/dyn/g la 26°C).

Alt mod de exprimare se bazează pe densitatea relativă a lipoproteinelor (g/ml).

Separarea electroforetică a lipoproteinelor, bazată pe diferențele de încărcare electrică și greutate moleculară, se realizează în agaroză sau în gel de poliacrilamidă. Deși metoda electroforezei în agaroză este mai expeditivă și mai accesibilă laboratorului clinic, literatura de specialitate clasifică lipoproteinele mai ales pe baza densității lor. În tabelul 1.1. sînt redate caracteristicile și compoziția diferitelor clase de lipoproteine indicînd totodată mobilitatea lor electroforetică.

După cum reiese din tabel, *chilomicronii,* proveniți din lipidele alimentare, absorbite din intestin, sînt alcătuiți mai ales din trigliceride. Avînd în structura lor doar mici cantități de apoproteine, densitatea chilomicronilor este extrem de joasă, aceștia flotînd cu ușurință, iar datorită slabei lor încărcări electronegative nu migrează electroforetic.

Un conținut important de trigliceride se găsește și în *lipoproteinele cu densitatea foarte joasă (prebeta lipoproteine, VLDL),* dar spre deosebire de chilomicroni, aceste trigliceride sînt de proveniență endogenă fiind sintetizate la nivelul ficatului. Deși mai voluminoase decît LDL (beta lipoproteine), VLDL migrează înaintea acestora la electroforeza în agaroză, probabil datorită unor apoproteine cu puternică încărcare electronegativă. Pe de altă parte, la electroforeza în gel de poliacrilamidă, care realizează o „cernere moleculară", VLDL migrează înapoia LDL.

Lipoproteinele cu densitate joasă (LDL, beta lipoproteine) bogate în esteri de colesterol și avînd, practic, o singură apoproteină majoră în structura lor (apoproteina B) au putut fi subdivizate în două subfracțiuni: LDL_1 (densitate 1,006—1,019 g/ml) și LDL_2 (densitate 1,019—1,063 g/ml), aceasta din urmă reprezentînd componenta majoră din plasmă.

La rîndul lor, *lipoproteinele cu densitate mare (HDL, alfa lipoproteinele)* au fost subîmpărțite în HDL_2 (densitate 1,063—1,125 g/ml), HDL_3 (densitate 1,125—1,21 g/ml). Există și cantități infime dintr-o subclasă HDL_1 avînd un conținut mai ridicat, în esteri de colesterol decît HDL_2. Semnificația subfracțiunilor LDL și HDL va putea fi înțeleasă după prezentarea metabolismului lipoproteinelor (vezi pag. 35 și pag. 39).

Alte lipoproteine (Lp (a), B-VLDL, Lp (x). Corespondența între fracțiunile obținute pe baza densității prin ultracentrifugare și cele separate electroforetic (tabelul 1.1) nu este întotdeauna respectată. Așa, de exemplu, la 10—20% din subiecți (normo- sau hiperlipemici) se constată creșterea unei prebeta lipoproteine care însă, avînd o densitate mai ridicată, nu flotează ci sedimentează. Această *prebeta lipoproteină* care *„se scufundă" (sinking prebeta)* sau Lp (a) nu are o semnificație încă bine definită.

Avînd de altfel o compoziție lipidică și o densitate (1,05—1,10 g/ml), similară cu LDL, discriminarea dintre Lp(a) și LDL a întîmpinat dificultăți pînă cînd metodele imunochimice au fost în măsură să demonstreze o structură particulară a componentelor proteice din Lp(a). Se

Tabelul 1.1

Compoziția lipoproteinelor izolate de la subiecții normali. Întocmit pe baza datelor preluate după Schaefer și Levy (45) completate cu date privind prezența apoproteinelor în diversele clase

Clasa de lipoproteine	Densitate	Mobilitate electroforetică	Compoziție (valori procentuale)					Natura apoproteinelor din structura lipoprot.	
			Trigliceride	Colesterol		Fosfolipide	Proteine	Componente majore	Componente minore
				liber	esteri				
Chilomicroni	0,94 (Sf. 400)	origine (nu migrează)	85—95	1—3	2—4	3—6	1—2	A-I, A-IV, B_{48}, C-I, C-III, E	A-II, C-II
Lipoproteine cu densitate foarte joasă (VLDL)	0,94—1.006 (Sf. 20—400)	Prebeta	50—65	4—8	12—22	15—20	6—10	B-100, E C I, C II, C III	A-I, A-II, A-IV
Lipoproteine cu densitate joasă (LDL)	1.006—1.063 (Sf. 0—20)	Beta	4—8	6—8	45—50	18—24	18—22	B-100	Eventual urme de C I, C II, C III, E
Lipoproteine dense (HDL)	1063—1.21	Alfa	2—7	3—5	15—20	26—32	45—55	A I, A II, E	C I, C II, C III, D

ştie astăzi că alături de apoproteina B, caracteristică pentru LDL, Lp(a) mai conţine o glicoproteină cu greutate moleculară de 650.000 legată prin punţi disulfidice de apo B şi denumită apoproteina (a). Nivelul plasmatic de Lp(a) variază de la nedecelabil la peste 100 mg/dl dar mai bine de 75% din populaţie prezintă valori sub 20 mg/dl. Recent (40 b), s-a arătat că nivelul crescut de Lp(a) creează o accentuată predispoziţie pentru dezvoltarea aterosclerozei, iar analiza structurii apoLp(a) a evidenţiat că un segment al acestei glicoproteine prezintă o izbitoare analogie cu cea a plasminogenului, ceea ce sugerează o posibilă inhibare competitivă a fibrinolizei de către Lp(a).

Din catabolismul VLDL rezultă lipoproteine cu densitate intermediară (IDL, densitate între LDL şi VLDL) în cantităţi foarte mici la subiecţi normali. În hiperlipoproteinemia tip III şi alimentaţia hipercolesterolemiantă apare însă o fracţiune constituită din resturi catabolizate parţial de VLDL şi de chilomicroni, care flotează împreună cu VLDL dar migrează electroforetic cu beta lipoproteinele de unde şi numele de *beta-VLDL* (beta lată, beta care flotează).

O lipoproteină care apare în cazurile de colestază extrahepatică (icter mecanic) este aşa-zisa *lipoproteină* X (Lp X). La electroforeza în agaroză Lp X migrează înapoia fracţiunii beta iar în cazul electroforezei în agar este singura lipoproteină care migrează spre polul negativ. Ca structură Lp X s-a dovedit alcătuită mai ales din colesterol liber, fosfolipide şi mici cantităţi de apoproteină C.

În cele ce urmează vom analiza pe scurt diversele componente care intră în structura lipoproteinelor.

I.2.1.1. APOPROTEINELE

Graţie metodelor imunochimice cît şi electroforezei în gel de poliacrilamidă a lipoproteinelor în prealabil separate prin ultracentrifugare şi delipidate s-au putut izola o serie de proteine care poartă denumirea de apoproteine (tabelul 1.2). S-a putut preciza că locul de sinteză al apoproteinelor este reprezentat de ficat şi intestin, s-au determinat greutăţile lor moleculare precum şi secvenţa aminoacizilor din structura lor şi s-au făcut eforturi pentru a înţelege semnificaţia lor funcţională (7,45). În esenţă, rolul apoproteinelor ar putea fi astfel sistematizat:

A) Apoproteinele asigură menţinerea în soluţie a lipidelor plasmatice şi implicit transportul lor;

B) Unele apoproteine constituie cofactori importanţi ai unor reacţii enzimatice implicate în metabolismul lipidelor. Aşa, de exemplu, apo C-II este un cofactor al lipoproteinlipazei (LPL) cu rol în hidroliza trigliceridelor din chilomicroni şi VLDL (vezi pag. 27). De asemenea, apoproteina A-I este un cofactor al reacţiei de esterificare a colesterolului catalizată de lecitin-colesterol-aciltransferază (LCAT) (vezi pag. 34);

C) O serie de apoproteine, ca de exemplu apo B-100 în LDL, apo B-48 în chilomicroni şi apo E în VLDL. IDL şi HDL reprezintă liganzii, respectiv unităţile prin intermediul cărora receptorii celulari recunosc, captează şi internalizează pentru catabolizare lipoproteinele res-

Caracteristici și funcțiuni ale apoproteinelor. Toate apoproteinele au rol în menținerea structurii și respectiv stabilitatea lipoproteinelor LCAT-lecitincolesterol-aciltransferază, LPL-lipoproteinlipază, după datele din literatură (7, 18, 40 45).

Apoproteine	Greutate moleculară aproximativă	Concentrație plasmatică medie (mg/dl)	Clasa de lipoproteine în care apare	Funcție
A-I	28,300	160	HDL chilomicr.	Cofactor al LCAT
A-II	17.000	35	HDL chilomicr.	Cofactor pentru lipaza hepatică (?)
A-IV	46.000	15	chilomicr.	?
B-100 (B_H)	549.000	80	VLDL, LDL	Ligand prin care LDL sînt captate de receptori celulari
B-48 (B_L)	260.000	urme	chilomicr.	Ligand pentru captarea resturilor de chilomicroni.
C I	6.300	7	chilomicr. VLDL HDL	Slab efect de activare a LCAT
C II	8.800	4	VLDL, HDL, chilomicr. (urme)	Cofactor al LPL
C III	8.800	13	chilomicr. VLDL	Limitează acțiunea LPL; întîrzie captarea resturilor chilomicr.
D (A-III)	32.500	6	HDL (urme)	?
E	37.000	5	chilomicr. VLDL HDL	Ligand pentru captarea lipoproteinelor de către receptorii celulari

S-au mai descris apoproteinele F, G și H dar semnificația funcțională a acestora este încă neelucidată.

pective. Este evident că perturbarea proceselor amintite poate surveni fie din cauza unui defect al receptorilor, fie ca urmare a unor mutații care alterează structura apoproteinelor cu rol de ligand (vezi pag. 36).

De precizat că apo B se găsește în organism sub două variante: una cu greutate moleculară relativ joasă (apo B_L sau apo B_{48}) care se găsește în chilomicroni și este sintetizată în mucoasa intestinală și o variantă cu greutate moleculară mai mare (apo B_H sau apo B_{100}) sintetizată în ficat

și încorporată în VLDL, IDL și LDL. Interesant este faptul că în organism există receptori specializați fie pentru apo B_{48}, fie pentru apoi B_{100} (20).

Merită semnalată și observația că în cursul dezvoltării leziunilor aterosclerotice apo B_{100} se acumulează la nivelul acestora în ritm mult accelerat față de colesterol, a cărui concentrație în leziune este rezultanta intrării și ieșirii. Astfel de observații denotă că apo B este mai greu epurată din leziune decît colesterolul (4). Se pare de altfel că nivelul plasmatic crescut al apo B_{100} reprezintă un factor de risc pentru ateroscleroză, mai important decît creșterea colesterolului sau trigliceridelor (45).

S-a mai arătat că atît o alimentație bogată în zaharoză cît și un aport alimentar crescut de lipide saturate și de colesterol crește sinteza hepatică de apo B_{100}. Factorii și mecanismele care reglează sinteza altor apoproteine sînt încă puțin cunoscuți.

Așa cum se va vedea în continuare, depistarea diverselor deficite sau anomalii ale apoproteinelor au contribuit în mare măsură la elucidarea mecanismelor de producere atît a hiperlipoproteinemiilor cît și a unor alipoproteinemii cu caracter genetic (vezi pag. 52 și pag. 62).

I.2.1.2. COMPONENTELE LIPIDICE ALE LIPOPROTEINELOR

Așa cum reiese din tabelul 1.1., principalele componente lipidice ale lipoproteinelor sînt trigliceridele, colesterolul și fosfolipidele. Dozarea acestor componente în diferitele clase de lipoproteine ar implica o separare prealabilă prin ultracentrifugare preparativă. O metodă mai simplă dar mai relativă constă în precipitarea VLDL și LDL cu dextran sulfat și $MnCl_2$, heparină și $MnCl_2$ sau fosfowolframat de sodiu și $MgCl_2$ și dozarea colesterolului din HDL în supernatant. Avînd în vedere că în VLDL concentrația colesterolului este de aproximativ 1/5 din cea a trigliceridelor (exprimate în mg/dl), se poate calcula concentrația colesterolului din LDL în mg/dl după formula (Friedewald):

$$\text{mg/dl LDL colesterol} = \text{colesterol total} - \left(\text{HDL colesterol} + \frac{\text{Trigliceride}}{5}\right)$$

Se poate de altfel considera că o creștere marcată a trigliceridelor coincide cu o creștere a VLDL sau/și a chilomicronilor, pe cînd o creștere solitară a colesterolemiei atrage atenția asupra LDL.

În cele ce urmează redăm caracteristicile și proveniența componentelor lipidice ale lipoproteinelor.

I.2.1.2.1. *TRIGLICERIDELE*

Trigliceridele sînt esteri ai glicerolului cu acizi grași (fig. 1.2). Gliceridele parțiale, respectiv mono- sau digliceridele conțin glicerol esterificat doar cu una sau două molecule de acizi grași, reprezintă probabil etape intermediare în procesul de sinteză sau degradare a trigliceridelor și se găsesc în plasmă în cantități mult reduse față de acestea.

Sursa trigliceridelor din organism este fie exogenă, din absorbția lipidelor alimentare (vezi pag. 27), fie endogenă, pornindu-se de la glicerol

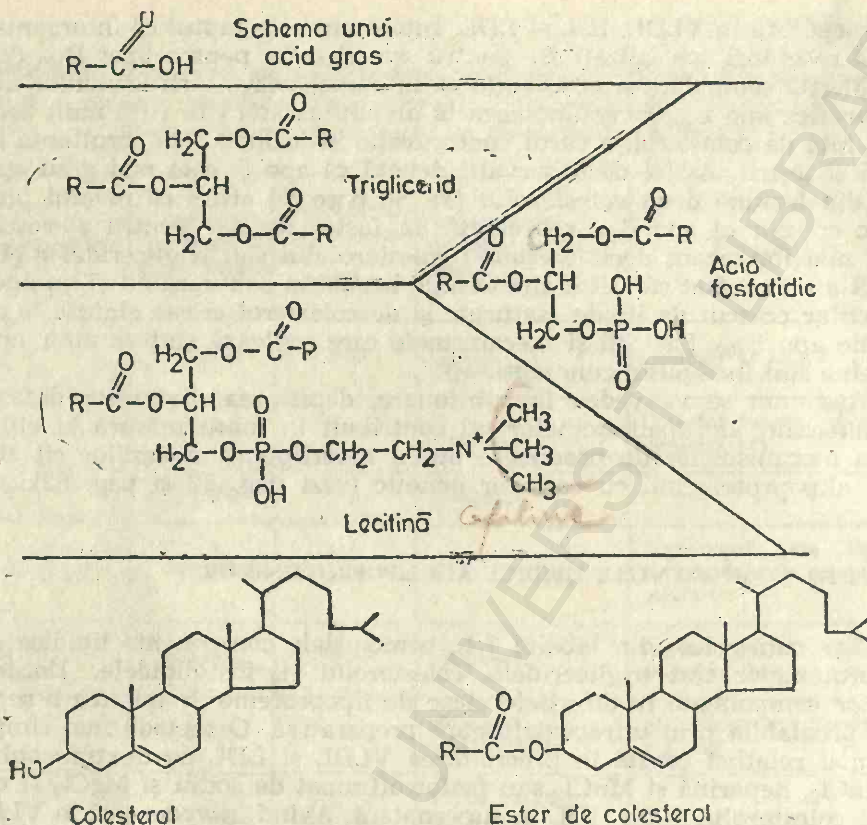


Fig. 1.2. Reprezentare schematică a principalelor componente lipidice din structura lipoproteinelor. Este redată și formula acidului fosfatidic care, deși nu se află în cantități semnificative în lipoproteinele serice, are o deosebită importanță metabolică, fiind un precursor al fosfolipidelor, iar pe de altă parte, după scindarea radicalului fosfat, sub acțiunea unei fosfataze, devine diglicerid care poate ulterior deveni triglicerid.

și acizi grași sau, mai precis, de la glicerol-3-fosfat și acil-CoA (acizi grași activați). În țesuturi ca ficatul, rinichii, glanda mamară sau mucoasa intestinală glicerol-3-fosfatul (alfa-glicerofosfatul) poate fi obținut prin fosforilarea directă a glicerolului deoarece celulele țesuturilor amintite sînt dotate cu glicerokinază, o enzimă care catalizează fosforilarea amintită. Dacă această enzimă lipsește sau este în cantitate redusă, ca de exemplu în musculatură sau în țesutul adipos, alfa-glicerofosfatul trebuie să provină dintr-un produs intermediar al glicolizei și anume din dihidroxiacetonfosfat (32).

La rîndul lor, acizii grași, care urmează a fi activați ca acizi-CoA sub acțiunea tiokinazei, provin fie din lipidele alimentare, fie din mobilizarea celor stocate în țesutul adipos (vezi pag. 29), fie prin sinteză din acetatul activat (acetil-CoA), un compus intermediar provenit atît din metabolismul hidraților de carbon cît și din aminoacizi. Sinteza de trigliceride

pe seama hidraţilor de carbon este deosebit de accentuată în cazul consumului de produse zaharoase, fapt care explică accentuarea anumitor forme de hipertrigliceridemie în condiţiile unui astfel de regim alimentar.

Produsul intermediar care rezultă din combinarea alfa glicerofosfatului cu două molecule de acil-CoA este un digliceridfosfat (acidul fosfatidic), procesul decurgînd cu eliminarea a două molecule de coenzimă A (CoA). Din acidul fosfatidic pot lua apoi naştere atît trigliceridele cît şi fosfolipidele (vezi fig. 1.2.). În cazul sintezei trigliceridelor din acidul fosfatidic, se elimină un radical fosfat sub acţiunea fosfatazei acidului fosfatidic (fosfatidatfosfohidrolaza) rezultînd un alfa-beta diglicerid care sub acţiunea unei diglicerid-acil-transferaze trece în triglicerid prin încorporarea unui acid gras activat.

Merită semnalate experienţele care demonstrează o creştere a activităţii fosfatidatfosfohidrolazei în hepatocitele animalelor supuse unui regim alimentar bogat în zaharoză şi prezentînd o accelerare consecutivă a sintezei de trigliceride în ficat. Aceste observaţii sugerează posibilitatea inducerii enzimelor cu rol în sinteza hepatică a trigliceridelor (29).

De altfel, ficatul şi ţesutul adipos constituie principalele producătoare de trigliceride, între acizii graşi mobilizaţi din ţesutul adipos şi trigliceridele hepatice încorporate în VLDL existînd un permanent transfer. O resinteză a trigliceridelor alimentare are loc în mucoasa intestinală, produsul fiind încorporat în chilomicroni (vezi pag. 27). Principalul rol al trigliceridelor din organism este acela de a stoca energie în ţesutul adipos şi de a o elibera la nevoie ca acizi graşi liberi ce urmează a fi catabolizaţi la nivelul musculaturii (vezi pag. 31).

I.2.1.2.2. *FOSFOLIPIDELE*

Principalele fosfolipide din organism sînt; 1) fosfatidilcolina (lecitina) a cărei structură este redată în fig. 1.2; 2) fosfatidiletanolamina (cefalina). conţinînd etanolamină în locul colinei; 3) acidul fosfatidic lipsit de baza azotată; 4) fosfatidilserina conţinînd serină (un aminoacid hidroxilat) în locul bazei azotate; 5) fosfatidilinozitol conţinînd inozitol (un polialcool ciclic) în locul bazei azotate; 6) lizolecitinele în care glicerolul combinat cu fosforilcolina este esterificat doar cu un acid gras; 7) sfingomielinele, care prin hidroliză eliberează un acid gras, acid fosforic, colină şi, spre deosebire de celelalte fosfolipide, conţin sfingozină (un alcool complex aminat) în loc de glicerol (32).

Biosinteza fosfolipidelor decurge oarecum în paralel cu cea a trigliceridelor pînă la etapa de acid fosfatidic sau de alfa, beta diglicerid. Din acest moment, în locul esterificării digliceridului cu un nou acid gras, ca în cazul trigliceridelor, are loc încorporarea grupărilor fosforilcolină sau fosforiletanolamină. Acest ultim proces este şi el catalizat enzimatic, implicînd o prealabilă „activare" a colinei şi, respectiv, etanolaminei.

Fosfolipidele plasmatice, avînd grupări polare hidrofile, contribuie la menţinerea suspensiilor de lipide plasmatice (vezi pag. 16 şi fig. 1.1). Există dovezi privitoare la prezenţa unor schimburi rapide între fosfolipidele plasmatice şi cele din membrana plăcuţelor sanguine (15) şi nu este exclus ca astfel de schimburi să se petreacă şi la nivelul altor membrane

celulare. De fapt, principalul rol fiziologic al fosfolipidelor este participarea lor la alcătuirea membranelor biologice. Pe de altă parte, eliberarea de acid arahidonic din membranele celulare, sub acţiunea fosfolipazei A_2, precum şi scindarea fosfatidilinozitolului difosfat (PiP_2), cu eliberarea de diacilglicerol (digliccrid) şi inozitoltrifosfat (IP_3), sub acţiunea fosfolipazei C, au un rol extrem de important în procesul de activare a celulelor. Dezvoltarea acestor aspecte ale metabolismului fosfolipidelor ar depăşi însă scopul prezentului capitol.

I.2.1.2.3. *COLESTEROLUL*

Structura acestui compus (3-hidroxi-5. 6-colesten) este reprezentată schematic în fig. 1.2. În plasmă, mai bine de 2/3 din colesterol se găseşte sub formă de esteri cu diverşi acizi graşi pe cînd în ţesuturi sau mai bine zis în membranele celulare colesterolul se află în formă neesterificată contribuind în mod esenţial la funcţionalitatea acestor membrane. Organismul uman conţine aproximativ 2 g colesterol/kg greutate corporală iar o cantitate de aproximativ 1—2% din rezervorul amintit este zilnic reînnoită. Sursa colesterolului din organism este exogenă, din colesterolul alimentar, şi endogenă, în care caz compusul se formează printr-un proces complex de sinteză care porneşte la acetil-CoA.

Alimentele cele mai bogate în colesterol sînt cele de origine animală şi în special creierul (3 g colesterol la 100 g aliment), gălbenuşul de ou (1700 mg la 100 g, respectiv 250 mg colesterol la un ou), rinichii (350 mg la 100 g), ficatul (250 mg la 100 g), untul (300 mg la 100 g) şi grăsimea de porc (100 mg la 100 g).

Colesterolul se absoarbe la nivelul intestinului în prezenţa sărurilor biliare. După intrarea în celulele mucoasei intestinale, el este încorporat în chilomicronii care intră în circulaţia sanguină pe calea sistemului limfatic (pag. 27). Proporţia de colesterol care se absoarbe depinde de cantitatea ingerată şi de conţinutul de trigliceride al dietei, acestea favorizînd absorbţia colesterolului. Pe lîngă o ingestie susţinută de aproximativ 300 mg/zi, absorbţia colesterolului este de 40—60% (deci cam 150 mg), pe cînd în cazul unei ingestii de 2—3 g/zi, procentul absorbit scade la 10% (respectiv 200—300 mg), fiind deci mai mare în valori absolute. Legătura dintre colesterolul alimentar şi nivelul colesterolemiei este însă mult mai complexă şi depinde de măsura în care celulele hepatice îşi reduc numărul de receptori pentru LDL în urma absorbţiei de colesterol alimentar (vezi pag. 36). Cea mai mare parte a colesterolului provine însă din *sinteza endogenă* (aproximativ 1 g zilnic). Aproape toate ţesuturile au capacitatea de a sintetiza colesterol. O astfel de sinteză a fost evidenţiată în ficat, intestin, corticosuprarenală, ovare, testicole, piele şi aortă. Cele mai active organe sînt însă peretele intestinal şi mai ales ficatul, ambele furnizînd peste 90% din colesterolul de origine endogenă.

Sinteza colesterolului (fig. 1.3) implică, într-o primă etapă, condensarea a două molecule de acetil-CoA, care pot proveni din metabolismul glucidelor, lipidelor sau proteinelor. La molecula de aceto-acetil-CoA astfel formată se condensează o altă moleculă de acetil-CoA obţinîndu-se un compus cu şase atomi de carbon. Acest compus, beta-hidroxi, betametilglutaril-CoA (HMG-CoA) este supus acţiunii unei reductaze

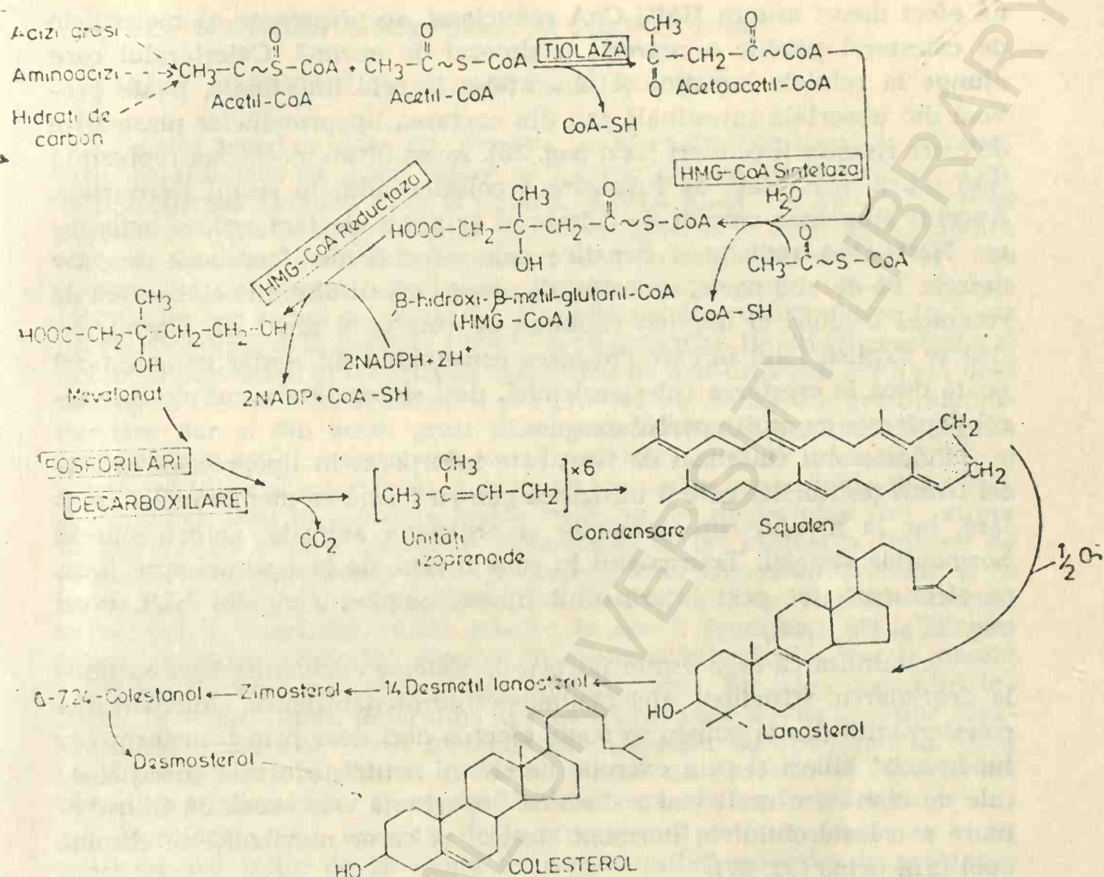


Fig. 1.3. Reprezentarea schematică a biosintezei colesterolului; beta-hidroxi-beta metilglutarilcoenzima A reductaza (HMG-CoA-reductaza) este enzima cheie (rate limiting- limitantă a vitezei) de care depinde viteza de sinteză a colesterolului. Acumularea intracelulară de colesterol reduce activitatea enzimei printr-un mecanism de represie (scăzînd producția de noi molecule de HMG-CoA reductază).

(HMG CoA reductaza) transformîndu-se în mevalonat, c,are este în centinuare fosforilat și decarboxilat, rezultînd unitatea izoprenoidă adică izopentenilpirofosfatul. Într-o serie de etape ulterioare, 6 unităţi isoprenoide active (5 atomi de carbon) se condensează formînd un compus liniar cu 30 de atomi de carbon numit scualen. Prin închiderea la mai multe nivele a lanțului de atomi de carbon se formează cele patru inele caracteristice steroizilor. Primul compus cu o astfel de structură (ciclopentanoperhidrofenantrenică) este lanosterolul care, trecînd apoi prin cîteva etape intermediare (zimosterol și desmosterol), ajunge la colesterol.

Este important de precizat că reglarea sintezei de colesterol are loc încă din etapele inițiale și anume la nivelul reacției catalizate de HMG-CoA reductază, activitatea acestei enzime diminuînd atunci cînd se produce o acumulare de colesterol în celulă. Întrucît colesterolul nu are

un efect direct asupra HMG-CoA reductazei, se presupune că moleculele de colesterol produc o represie a sintezei de enzimă. Colesterolul care ajunge la celulele hepatice și bineînțeles la cele intestinale, poate proveni din absorbția intestinală sau din captarea lipoproteinelor plasmatice de către receptorii celulari (vezi pag. 36). Acest ultim mecanism reprezintă însă unica modalitate de furnizare a colesterolului în restul țesuturilor. Aportul alimentar crescut de colesterol ar putea de fapt reduce activitatea HMG-CoA reductazei hepatice prin efectul de feed-back negativ descris. Pe de altă parte, un astfel de aport crescut diminuă elaborarea de receptori celulari și implicit captarea de colesterol din LDL plasmatice. Așa se explică felul în care creșterea consumului alimentar de colesterol poate duce la creșterea colesterolemiei, deși sinteza endogenă de colesterol depășește cu mult aportul exogen.

Colesterolul sintetizat de ficat este încorporat în lipoproteine și astfel trimis țesuturilor care îl utilizează pentru formarea membranelor celulare, iar la nivelul suprarenalelor și organelor sexuale pentru sinteza hormonilor steroizi. Transportul în sens invers, de la țesuturi spre ficat, se efectuează tot prin intermediul lipoproteinelor, mai ales HDL (vezi pag. 38 și fig. 1.11.).

Reamintim că organismul nu posedă sisteme enzimatice care să ducă la degradarea structurii ciclopentanoperhidrofenantrenice. Îndepărtarea colesterolului din organism se poate efectua deci doar prin transformarea lui în acizi biliari și prin excreție de steroli neutri prin bilă și fecale. O cale de eliminare mult mai redusă ca importanță este aceea de transformare a colesterolului în hormoni steroizi ai căror metaboliți se elimină apoi prin urină (32, 37).

I.2.2. MECANISME IMPLICATE ÎN TRANSPORTUL PLASMATIC AL LIPIDELOR

În esență, transportul lipidelor în organism se realizează pe următoarele căi:

a) Transportul lipidelor absorbite la nivelul intestinului se realizează sub formă de chilomicroni;

b) Transportul de lipide mobilizate din rezervele țesutului adipos se efectuează sub formă de acizi grași liberi (AGL) fixați pe albumine serice;

c) Lipidele sintetizate în ficat sînt trimise țesuturilor extrahepatice sub formă de lipoproteine (mai ales VLDL și LDL);

d) Transportul colesterolului de la țesuturile extrahepatice la ficat se realizează printr-un mecanism complex ce implică lipoproteinele dense (HDL) și enzima lecitincolesterolaciltransferaza (LCAT).

I.2.2.1. TRANSPORTUL SUB FORMĂ DE CHILOMICRONI

I.2.2.1.1. *MECANISMUL ABSORBȚIEI LIPIDELOR*

Se știe astăzi că doar aproximativ un sfert din trigliceridele alimentare, emulsionate de acizii biliari și expuse acțiuni lipazei pancreatice, se hidrolizează complet pînă la glicerol și acizi grași. De fapt, principalii produși de digestie ai grăsimilor sînt monogliceridele care, pătrunzînd ca atare în mucoasa intestinală, sînt hidrolizate în celulele mucoasei de către o monogliceridlipază și eliberează glicerol și acizi grași. Tot în celulele intestinale are loc și o resinteză a trigliceridelor, utilizîndu-se în acest proces fie gliceridele parțiale (mono- și digliceride), fie alfaglicerofosfatul și bineînțeles acizii grași activați sub formă de acil-CoA sub acțiunea unei tiokinaze. De notat că acizii grași pot proveni nu numai din grăsimile alimentare dar și din acizii grași liberi mobilizați din țesutul adipos. La trigliceridele astfel resintetizate se adaugă mici cantități de fosfolipide și colesterol (liber și esterificat) și proteine (respectiv apoproteina B-48, A-I, A-II, A-IV). Deși în cantitate foarte mică, aceste apoproteine sînt extrem de importante pentru formarea chilomicronilor iar inhibarea sintezei de proteine prin puromicină duce la oprirea formării chilomicronilor și la acumularea de grăsimi în celulele mucoasei intestinale. Același fenomen survine și în cazul deficitului genetic de apo B (vezi pag. 62). Chilomicronii „în stare născîndă", formați în mucoasa intestinală, trec în vasele limfatice ale mucoasei abdominale ajungînd apoi, pe calea canalului toracic, în sînge, unde determină un oarecare grad de lactescență postprandială a plasmei. Acest fenomen este deosebit de accentuat în cazul unui prînz bogat în grăsimi și alcool, despre care se știe că favorizează absorbția trigliceridelor și totodată întîrzie captarea lor în țesuturi.

Menționăm ca o excepție de la mecanismul amintit faptul că acizii grași cu mai puțin de 10 atomi de carbon (aflați mai ales în grăsimile din lapte) nu participă la formarea chilomicronilor și se absorb aproape exclusiv pe calea sîngelui portal (32).

I.2.2.1.2. *CATABOLISMUL CHILOMICRONILOR. LIPOPROTEINLIPAZA*

Chilomicronii formați în mucoasa intestinală și trecuți în sînge sînt supuși următoarelor procese; a) hidroliza trigliceridelor sub acțiunea lipoproteinlipazei și lipazei hepatice; b) schimburi neenzimatice cu lipidele și mai ales cu apoproteinele din HDL; c) captarea „resturilor" de chilomicroni de către hepatocite prin intermediul unor receptori specifici (receptori apo B 48/apo E).

Așa cum se vede din figura 1.4, la scurt timp de la pătrunderea lor în circulație chilomicronii captează apoproteine C și E provenite din HDL. Apoproteina C-II, un important cofactor al lipoproteinlipazei (6), potențează acțiunea acestei enzime localizate la nivelul endoteliilor vasculare (mai ales capilare), producîndu-se astfel hidroliza trigliceridelor și reducerea masei chilomicronilor. Paralel cu procesul amintit, apoproteinele A și o parte a apoproteinelor C părăsesc chilomicronii, fiind captate în HDL. Restul de chilomicroni, de dimensiuni mult reduse, pătrunde în spațiile

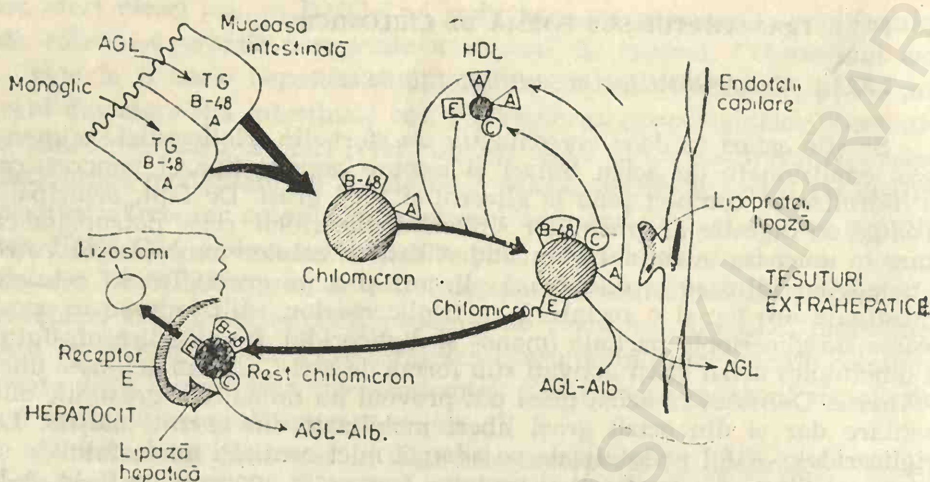


Fig. 1.4. Transportul trigliceridelor de origine alimentară prin formarea şi metabolizarea chilomicronilor. Explicaţia în text.

Disse în contact cu hepatocitele. La acest nivel, după un nou atac hidrolitic efectuat de lipaza hepatică şi care duce la îndepărtarea unei noi cantităţi de trigliceride şi de fosfolipide, resturile de chilomicroni, avînd în compoziţia lor mai ales apoproteinele B-48 şi E, sînt captate, prin intermediul unor receptori hepatocelulari specifici, internalizate şi catabolizate în lizozomi, eliberînd materialul conţinut spre a fi reutilizat de hepatocite (24, 45).

De menţionat că apoproteina C-III întîrzie catabolizarea chilomicronilor atît printr-un proces de inhibare a lipoproteinlipazei cît şi prin interferenţa cu procesul de captare a resturilor. Semnificaţia fiziologică a acestor efecte ale apo C-III este încă neelucidată. Nu poate fi însă exclusă ipoteza că pe această cale se permite o eliberare progresivă a acizilor graşi şi a glicerolului prevenindu-se o prea bruscă creştere a concentraţiei lor în plasmă şi permiţîndu-se o captare eficientă a produşilor de hidroliză de către ţesuturi. Principalul ţesut care captează acizii graşi eliberaţi sub acţiunea lipoproteinlipazei este ţesutul adipos, ale cărui capilare conţin enzima menţionată în cantităţi mai mari. Activitatea lipoproteinlipazei este supusă unei anumite reglări, dovedindu-se că alimentaţia, glucoza şi insulina o stimulează, în timp ce catecolaminele, ACTH şi glicocorticoizii, precum şi stress-ul sau flămînzirea o inhibă. Pe de altă parte, există dovezi că la nivelul capilarelor musculaturii enzima amintită se activează mai ales în cursul efortului (42).

Lipoproteinlipaza din capilarele ţesutului adipos nu trebuie confundată cu lipaza hormonodependentă, localizată în interiorul adipocitelor activabilă sub acţiunea catecolaminelor (vezi pag. 30) şi avînd drept efect scindarea trigliceridelor din adipocite şi mobilizarea lipidelor de rezervă sub formă de acizi graşi liberi. De fapt, între lipoproteinlipază şi lipaza hormonodependentă (adipolitică) există un oarecare antagonism funcţional reprezentat în fig. 1.5.

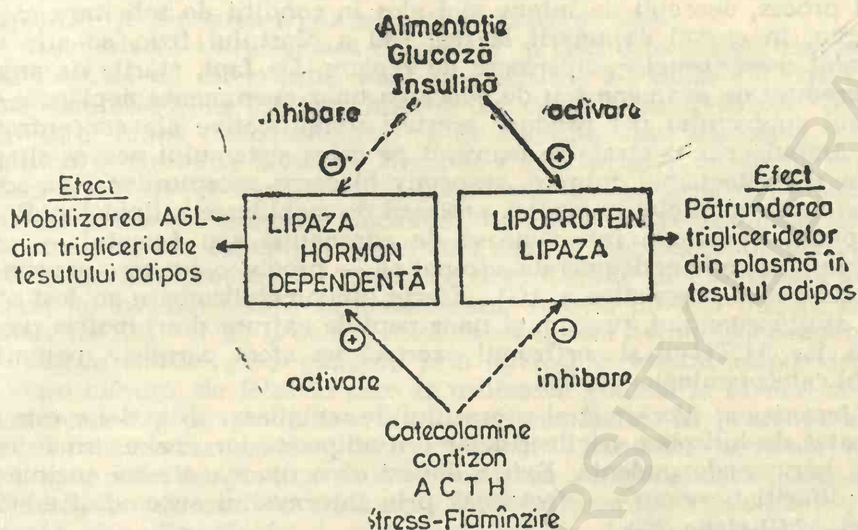


Fig. 1.5. Antagonismul funcțional dintre lipoproteinlipază și lipaza hormonodependentă.

În laboratorul clinic activitatea lipoproteinlipazei se determină după o prealabilă injectare de heparină care activează și desprinde enzima de pe suprafața endoteliilor și permite astfel evaluarea ei în plasmă pe baza eliberării de acizi grași și glicerol dintr-un substrat de trigliceride. În realitate, această activitate lipolitică postheparinică a plasmei nu se datorește doar lipoproteinlipazei ci și altor enzime lipolitice, ca de exemplu lipaza hepatică și unele psfolipaze. Spre deosebire de acestea, lipoproteinlipaza este inhibată de sulfatul de protamină, ceea ce permite o oarecare diferențiere a activității sale.

Se pare că mecanismele implicate în lipoliză și în captarea trigliceridelor sînt condiționate genetic, unii subiecți avînd o capacitate relativ mai mică de a îndepărta trigliceridele din plasmă. Ca urmare, astfel de subiecți, inițial normolipemici, pot dezvolta pe parcurs o hipertrigliceridemie dacă la defectul minor de clarificare menționat se asociază o hiperproducție hepatică de trigliceride. Aceasta cu atît mai mult cu cît mecanismele de îndepărtare a trigliceridelor din plasmă sînt saturabile, ele putînd fi relativ ușor depășite de o pătrundere excesivă de trigliceride provenite de la ficat prin secreție de VLDL, sau de la intestin prin absorbție.

Defecte mai exprimate ale activității lipolitice postheparinice se întîlnesc în cursul hiperlipemiei alcoolicilor, în diabetul zaharat cu deficit de insulină și acidocetoză și în unele cazuri de hipotiroidism (9, 38, 45), iar scăderea pînă la valori nule a lipoproteinlipazei reprezintă o caracteristică a hiperlipoproteinemiei tip I (vezi pag. 52).

1.2.2.2. TRANSPORTUL SUB FORMĂ DE ACIZI GRAȘI. MOBILIZAREA LIPIDELOR

Țesutul adipos reprezintă o importantă rezervă de energie, iar trigliceridele, stocate aici și provenite atît din lipidele alimentare cît și din cele sintetizate de ficat și captate ulterior în adipocite, pot fi cu ușurință mobilizate și trimise țesuturilor sub formă de acizi grași liberi (AGL).

Acest proces, deosebit de intens mai ales în condiţii de solicitare ca, de exemplu, în cursul expunerii la frig sau a efortului fizic, se află sub *controlul mecanismelor superioare de reglare.* De fapt, stările de anxietate produse de examene sau de evocarea unor evenimente neplăcute din trecutul subiectului pot produce creşteri semnificative ale concentraţiei AGL. Impulsurile centrale se transmit pe calea sistemului nervos simpatic, iar simpatectomia chimică, respectiv blocarea receptorilor beta-adrenergici cu propranolol împiedică procesul de mobilizare a lipidelor. Pe de altă parte, injectarea intravenoasă de adrenalină sau fumatul — care produce o secreţie endogenă de adrenalină — produc o creştere exprimată a concentraţiei plasmatice a AGL. Efecte lipidomobilizatoare au fost atribuite şi glucagonului, precum şi unor peptide extrase din hipofiza posterioară, iar ACTH-ul şi cortizonul exercită un efect permisiv, potenţînd efectul catecolaminelor (8, 32).

Mecanismul biochimic al procesului de mobilizare a lipidelor este reprezentat de hidroliza trigliceridelor din adipocite iar enzima cheie este lipaza hormonodependentă. Există dovezi că activarea acestei enzime de către diferiţi hormoni se efectuează prin intermediul sistemului adenilciclază-AMP-ciclic (32).

Aşa cum se arată în fig. 1.6, diverşii stimuli hormonali, reprezentînd un prim mesager, acţionează asupra receptorului celular activînd adenilciclaza din membrană. Sub acţiunea enzimei menţionate se eliberează din ATP, în interiorul celulelor, acid adenozinmonofosforic ciclic (3'—5'-AMP ciclic, sau c-AMP). Acesta devine al doilea mesager, prin intermediul că-

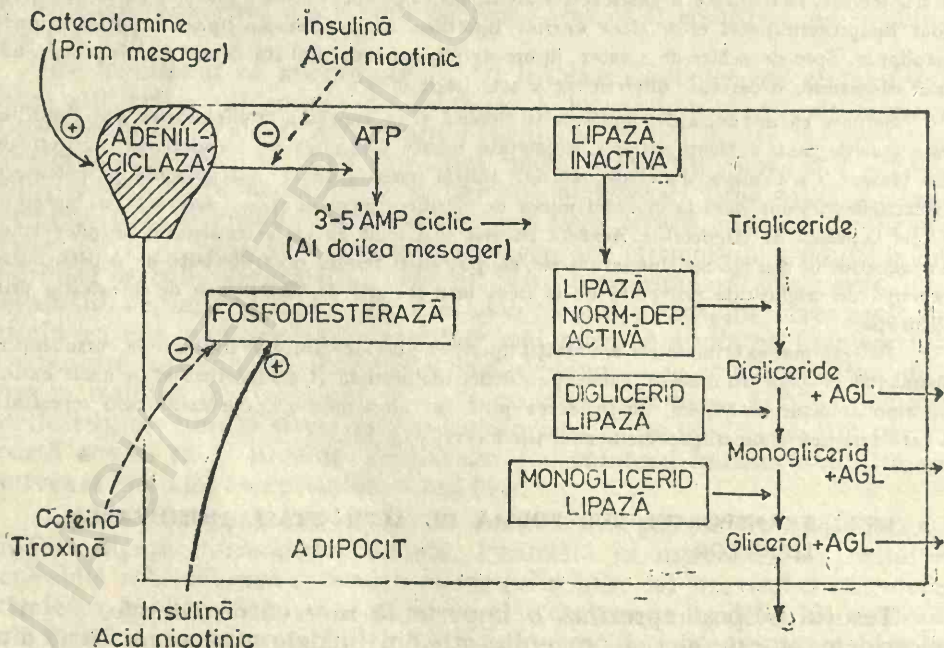


Fig. 1.6. Intervenţia sistemului adenilciclază-AMP ciclic în procesul de mobilizare al acizilor graşi din trigliceridele ţesutului adipos.

ruia se declanșează răspunsul în organul țintă, adică activarea lipazei adipolitice și scindarea trigliceridelor în cazul de față.

Acumularea intracelulară de c-AMP și deci intensitatea răspunsului este limitată de intervenția unei alte enzime, 3-5-nucleotid-fosfodiesteraza, care scindează legătura internă din c-AMP inactivîndu-l. Toți factorii care inhibă fosfodiesteraza, ca de exemplu metilxantinele (cafeina, teofilina) și probabil hormonii tiroidei, vor favoriza acumularea intracelulară a c-AMP și vor amplifica răspunsul celulei. O situație obișnuită care ilustrează mecanismele biochimice amintite este reprezentată de efectele sinergice ale fumatului și cofeinei asupra mobilizării de acizi grași. Astfel, nicotina produce o secreție de catecolamine care activează adenilciclaza iar cafeina inhibă fosfodiesteraza, ambele procese ducînd la acumulare de AMP ciclic și deci la stimularea lipazei hormonodependente.

Soarta acizilor grași eliberați prin lipoliză în țesutul adipos depinde, în mare măsură, de felul în care se utilizează glucoza la nivelul adipocitelor, respectiv de producerea de alfa-glicerofosfat. În prezența acestui produs intermediar, rezultat din glicoliză și în condițiile activării acizilor grași spre acil-CoA poate avea loc o resinteză a trigliceridelor. Dacă există dificultăți în procesul de utilizare a glucozei (inaniție sau diabet) și deci lipsește alfa-glicerofosfatul, sau dacă lipoliza depășește capacitatea de reesterificare, acizii grași părăsesc adipocitele și trec în sînge. De notat că, spre deosebire de acizii grași, glicerolul rezultat din lipoliză nu poate fi reutilizat în adipocite deoarece aceste celule sînt sărace în glicerokinază și nu îl pot transforma în alfa-glicerofosfat (așa cum s-a arătat mai sus acest metabolit este produs în țesutul adipos pe calea glicolizei).

Ca urmare, glicerolul, rezultat din lipoliză în țesutul adipos, trece în sînge, putînd fi apoi preluat de ficat și rinichi, care sînt mult mai bogate în glicerokinază.

La rîndul lor, acizii grași liberi (AGL), trecuți în circulație și fixați pe albuminele serice, sînt rapid captați de diverse țesuturi și, în special, de musculatură și de ficat. Datorită procesului de turn-over extrem de rapid al AGL (timp de înjumătățire biologică de 2—3 minute) se pot transporta pe această cale importante cantități de lipide spre a fi utilizate în scopuri energetice. Așa, de exemplu, în caz de flămînzire și expunere la frig, plasma poate transporta pînă la 500 g grăsimi în decurs de 24 de ore (8).

După pătrunderea lor în celule, acizii grași sînt activați spre acil-CoA la nivelul microzomilor și pe membrana externă a mitocondriilor. Pătrunderea acil-CoA în mitocondrii și respectiv accesul la sistemul enzimatic al beta-oxidării este condiționată însă de prezența carnitinei (beta-hidroxi-gamma-trimetilamoniubutirat), un compus care, în mod normal, se găsește din abundență în musculatură. Pătrunderea acizilor grași în mitocondrii este precedată de formarea tranzitorie a unei acilcarnitine, într-o reacție catalizată de enzima carnitin-palmitil-aciltransferază, aflată în membrana mitocondriilor (32). Carnitina nu pătrunde însă în mitocondrii.



Acil—CoA + carnitină ——————————→ acilcarnitină + CoA

Carnitin-palmitil transferează

Deficitul de carnitină, care apare adeseori, în mod secundar, la pacienții cu insuficiență renală cronică supuși la dializă cronică sau în rarele cazuri cu deficite genetice, se însoțește

de o perturbare severă a proceselor de oxidare a acizilor grași. Aceeași perturbare survine și în cazul deficitului genetic de carnitin-palmitil-transferază. Drept consecință a încetinirii procesului de beta-oxidare apare o miopatie cu infiltrare de trigliceride a musculaturii scheletice, în unele forme cu caracter generalizat interesînd și miocardul și ficatul. Interesant este faptul că deficitul amintit evoluează și cu o creștere a trigliceridelor plasmatice realizînd adeseori hiperlipoproteinemii tip IV (1).

De altfel, chiar și în condiții normale o bună parte a AGL mobilizați din țesutul adipos și ajunși în ficat sînt încorporați în trigliceride, care sînt secretate apoi sub formă de VLDL (8).

I.2.2.3. TRANSPORTUL DE LIPIDE ÎNCORPORATE ÎN LIPOPROTEINE

Transportul de lipide sub formă de lipoproteine include următoarele aspecte; 1) sinteza și secreția lipoproteinelor; 2) modificări ale lipoproteinelor circulante sub acțiunea unor enzime și prin transferul neenzimatic de lipide și apoproteine între diversele clase de lipoproteine; 3) captarea lipoproteinelor la nivelul unor receptori celulari, urmată de internalizarea și degradarea lor; 4) transportul de colesterol de la țesuturile extrahepatice spre ficat în vederea eliminării prin bilă.

I.2.2.3.1. *SINTEZA ȘI SECREȚIA DE LIPOPROTEINE*

Aceste procese au loc mai ales la nivelul hepatocitelor, intestinul contribuind doar într-o oarecare măsură la producția de HDL (o anumită fracțiune) și, bineînțeles, așa cum s-a arătat anterior, dînd naștere chilomicronilor. Un studiu cantitativ experimental a demonstrat că la șobolan ficatul produce 81% din totalul apoproteinelor, restul de 19% revenind intestinului (24).

Hepatocitele sintetizează VLDL, HDL și, în anumite condiții, LDL și beta-VLDL. Această sinteză implică următoarele procese: 1) sinteza componentelor lipidice (trigliceride, fosfolipide, colesterol) (vezi pag. 21); 2) sinteza apoproteinelor; 3) formarea legăturilor între apoproteine și componentele lipidice; 4) exportul veziculelor lipoproteice în torentul circulator.

În figura 1.7 este reprezentată în mod schematic sinteza și secreția de VLDL la nivelul hepatocitelor. Particulele sînt asamblate în reticulul endoplasmatic neted iar apoproteinele sînt sintetizate în reticulul endoplasmatic rugos. Unirea particulelor lipidice cu apoproteinele (mai ales apo B-100 și apo E și doar cantități infime de apo C) are loc într-o zonă aflată între reticulul rugos și cel neted. Lipoproteinele „în stare nascîndă" sînt transportate în aparatul Golgi, unde are loc o completare a glicozilării proteinelor. Concentrate apoi în vezicule secretorii, lipoproteinele sînt eliberate în capilarele sinusoidale hepatice.

Secreția de VLDL poate fi dereglată de o serie de factori cum ar fi: a) inhibarea sintezei de proteine (prin puromicină, cicloheximidă, actinomicină D); b) interferența cu procesul de cuplare a apoproteinelor cu lipide (exces de acid orotic, deficit de colină) c) limitarea funcționalității sistemelor microtubulare ale celulei (de exemplu prin colchicină). Toți acești factori pot duce, în ultimă instanță, la dezvoltarea ficatului gras.

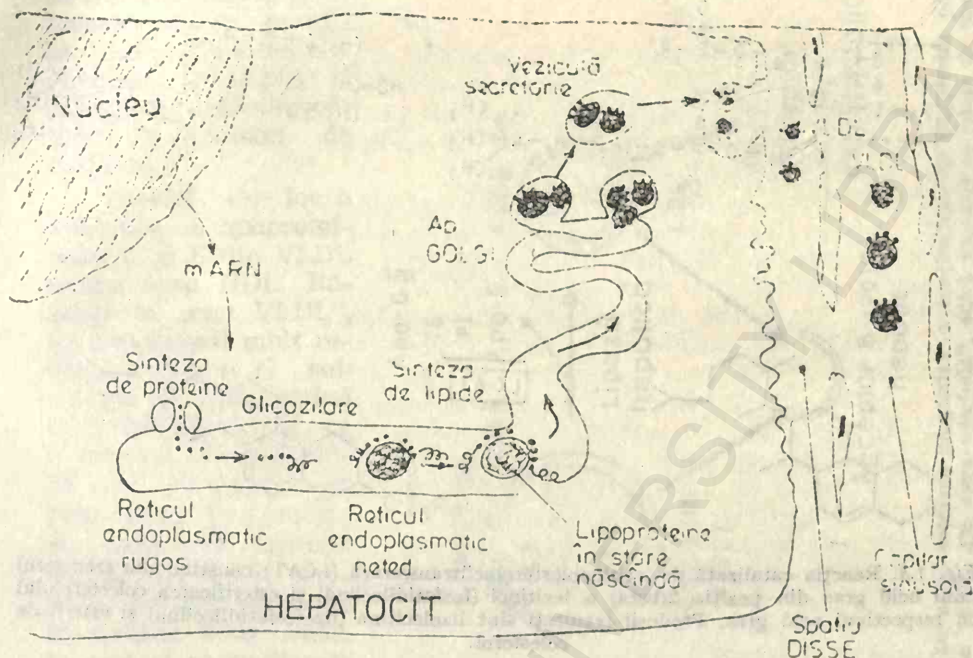


Fig 1.7. **Sinteza şi secreţia de VLDL la nivelul hepatocitelor.**

Pe de altă parte, obezitatea şi alimentaţia hipercalorică stimulează sinteza de VLDL. În cazul unei alimentaţii hiperglucidice creşte procentul de trigliceride din VLDL, pe cînd în urma unei alimentaţii bogate în grăsimi şi colesterol, VLDL vor deveni mai bogate în esteri de colesterol (24).

Sinteza HDL are loc după aceleaşi principii, atît în ficat cît şi în peretele intestinal. HDL de provenienţă intestinală sînt bogate în apo A-I, pe cînd cele hepatice conţin mai ales apo E. În plus, HDL mai conţin şi cantităţi variabile de apo A-II precum şi apo C-I, C-II, C-III, constituind un adevărat rezervor de apoproteine.

Mecanismele care reglează sinteza de HDL sînt mai puţin bine elucidate decît, cele care reglează pe cea a VLDL.

I.2.2.3.2. *MODIFICĂRI ALE LIPOPROTEINELOR ÎN PLASMĂ*

Lipoproteinele „născînde" secretate în plasmă suferă o serie de modificări înainte de a fi captate de receptorii celulari şi catabolizate în celule. Aceste modificări pot fi astfel sistematizate: 1) hidroliza trigliceridelor din lipoproteine sub acţiunea lipoproteinlipazei şi lipazei hepatice; 2) esterificarea colesterolului sub acţiunea lecitin-colesterol-aciltransferazei; 3) transferul de colesterol şi fosfolipide între diversele clase de lipoproteine; 4) transferul de apoproteine.

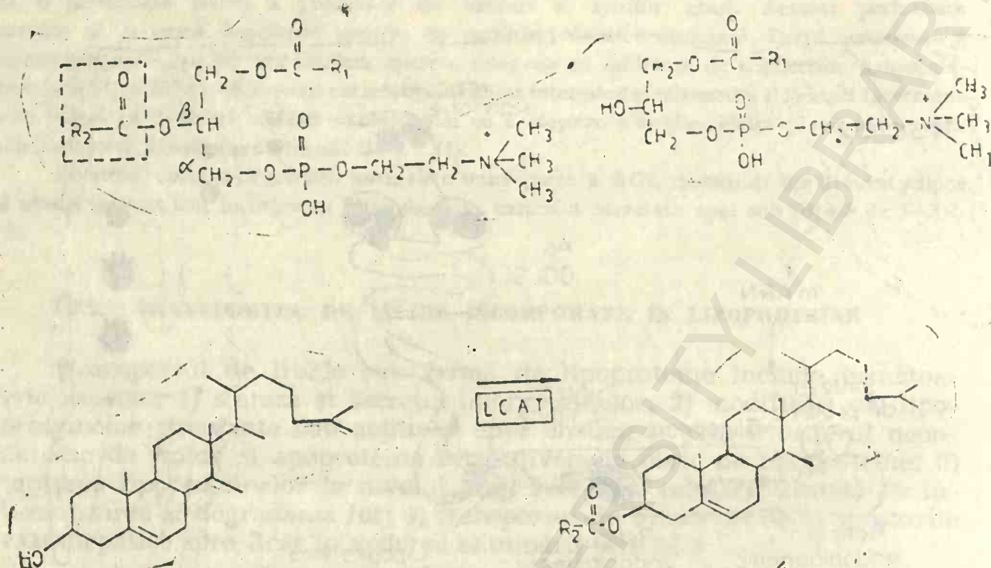


Fig. 1.8. **Reacţia catalizată de lecitincolesterolaciltransferază (LCAT) constînd din transferul unui acid gras din poziţia 2(beta) a lecitinei (fosfatidilcolină) şi esterificarea colesterolului cu respectivul acid gras. Produşii rezultaţi sînt lizolecitina (lizofosfatidilcolina) şi esterii de colesterol.**

Acţiunea lipoproteinlipazei a fost prezentată în legătură cu procesul de catabolizare al chilomicronilor (vezi pag. 27). Ca şi în cazul chilomicronilor, activitatea lipolitică este potenţată prin transferul de apo C-II din HDL spre VLDL. Ca urmare a acestei activităţi lipolitice, conţinutul în trigliceride al VLDL se reduce, în timp ce procentul relativ de colesterol şi fosfolipide creşte, alcătuind o peliculă mai densă care limitează acţiunea lipoproteinlipazei. Colesterolul liber şi fosfolipidele sînt, la rîndul lor, îndepărtate prin *intervenţia sistemului HDL — lecitin-colesterol — aciltransferază (LCAT).* Enzima menţionată şi secretată de ficat acţionează de preferinţă asupra substratelor lipidice din HDL, catalizînd reacţia de esterificare a colesterolului. Aşa cum reiese din fig. 1.8, mecanismul de acţiune al LCAT constă în transferul unui acid gras de pe o moleculă de lecitină pentru esterificarea unei molecule de colesterol liber. Lizolecitina care rezultă şi care este solubilă părăseşte lipoproteina şi se fixează pe albuminele serice.

Deşi reacţia amintită are loc la nivelul HDL, modificările în componenţa lipidelor se repercută asupra structurii VLDL care captează esterii de colesterol formaţi în HDL (sub acţiunea LCAT) şi cedează, în schimb, colesterol liber şi cantităţi variabile de trigliceride şi fosfolipide care trec în HDL.

Există astăzi dovezi că acest proces de transfer lipidic este condiţionat sau în orice caz facilitat de prezenţa unor proteine de transfer. Aşa-zisa proteină de transfer a esterilor de colesterol a putut fi izolată din plasmă, dovedindu-se a fi o glicoproteină cu greutate moleculară de 78.000 care se leagă de HDL şi asigură transferul de esteri de colesterol spre VLDL şi LDL.

Ca urmare a proceselor enzimatice şi de transfer lipidic amintite, VLDL pierd din trigliceride, fosfolipide şi colesterol liber îmbogăţindu-se în esteri de colesterol.

Paralel are loc o deplasare a apoproteinelor C şi E din VLDL înapoi spre HDL. Rămîne un „rest VLDL", de dimensiuni mult reduse, cunoscut şi sub numele de lipoproteină intermediară (IDL), cu o migrare electroforetică mai apropiată de beta- decît de prebeta- şi conţinînd aproape numai apo B-100 şi apo E. Aceasta pătrunde în spaţiile Disse unde, în contact cu capilarele sinusoidale hepatice conţinînd lipază hepatică, suferă un nou atac lipolitic care mai îndepărtează din trigliceridele şi fosfolipidele rămase. După ce pierd şi restul de apo- E şi rămîn doar cu apo B-100 ca şi componentă apoproteică majoră, aceste lipoproteine devin LDL. De notat însă că o bună parte a resturilor VLDL (IDL) poate fi captată ca atare de receptorii hepatici specifici (receptorii apo- B-100/apo E şi receptorii apo E).

Redăm în figura 1.9 modificările suferite de VLDL în plasmă (21, 24, 38, 45).

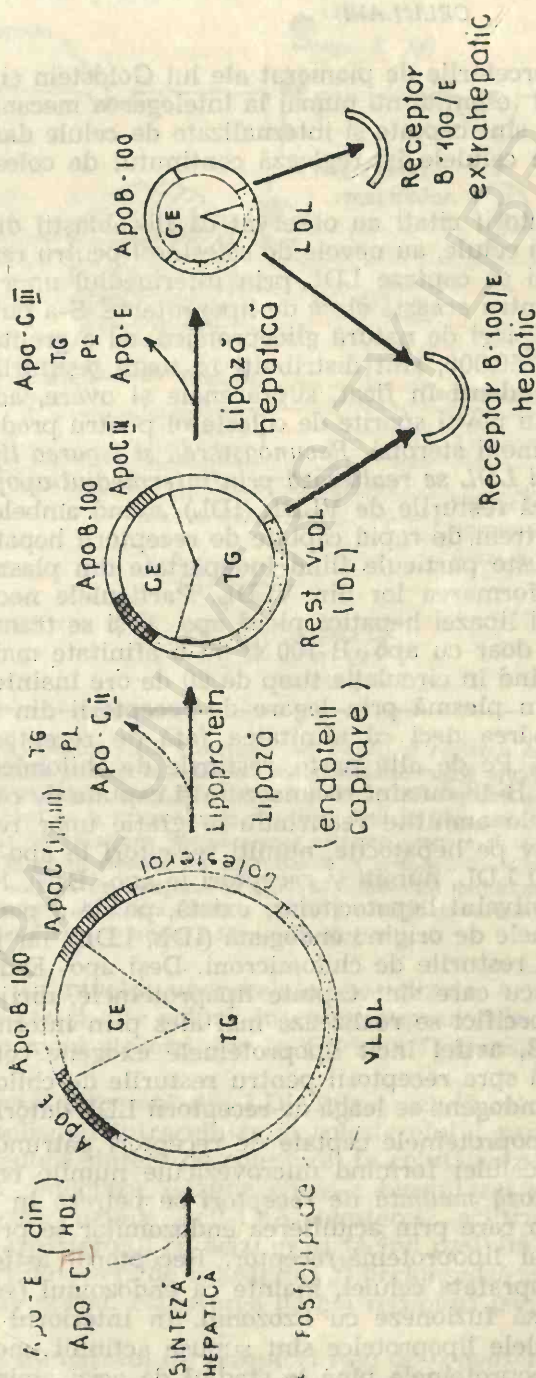


Fig. 1.9. **Modificările suferite de particulele de VLDL în plasmă. De notat scăderea progresivă a conţinutului de trigliceride precum şi transferul de apoproteine. Se poate vedea că particulele de VLDL „în stare nascîndă", adică proaspăt secretate de ficat, achiziţionează apo E şi apo C din HDL cedînd apoi progresiv aceste apoproteine.**

I.2.2.3.3. *CAPTAREA LIPOPROTEINELOR LA NIVELUL UNOR RECEPTORI CELULARI*

Cercetările de pionierat ale lui Goldstein și Brown (19) au contribuit în mod esențial nu numai la înțelegerea mecanismelor prin care lipoproteinele sînt captate și internalizate de celule dar și la elucidarea modului în care celulele își reglează conținutul de colesterol în funcție de necesități.

Autorii citați au observat că fibroblaștii din culturi, care, asemenea oricărei celule, au nevoie de colesterol pentru refacerea membranelor, sînt capabili să capteze LDL prin intermediul unor receptori cu mare afinitate pentru această clasă de lipoproteine. S-a putut ulterior arăta că astfel de receptori de natură glicoproteică, cu o greutate moleculară de aproximativ 160.000, sînt distribuiți în toate țesuturile animale, fiind deosebit de abundenți în ficat, suprarenale și ovare, adică mai ales în organele care au nevoi sporite de colesterol pentru producerea de acizi biliari sau de hormoni steroizi. *Recunoașterea și legarea lipoproteinelor de către receptorii LDL se realizează prin intermediul apoproteinelor B-100 și E.* De notat că resturile de VLDL (IDL), avînd ambele apoproteine menționate, sînt extrem de rapid captate de receptorii hepatici, aproximativ jumătate din aceste particule fiind îndepărtate din plasmă în decurs de 2—6 ore de la formarea lor din VLDL. Particulele necaptate în ficat și supuse acțiunii lipazei hepatice pierd apo- E și se transformă în LDL, care sînt dotate doar cu apo- B-100 și au o afinitate mai redusă pentru receptori, persistînd în circulație timp de 60 de ore înainte de a fi complet îndepărtate din plasmă prin legare de receptorii din ficat și din alte țesuturi. S-ar părea deci că afinitatea față de receptori este dată mai ales de apo- E. Pe de altă parte, resturile de chilomicroni prevăzute cu apo- E și apo- B-48 nu sînt recunoscute și captate de către receptori pentru LDL, procesele amintite realizîndu-se grație unor receptori diferiți, localizați exclusiv pe hepatocite, numiți receptori la apo- E (spre deosebire de receptorii LDL, numiți și receptori la apo- B/E). Reiese din cele de mai sus că, la nivelul hepatocitelor, există, pe de o parte, receptori pentru lipoproteinele de origine endogenă (IDL, LDL), iar pe de altă parte, receptori pentru resturile de chilomicroni. Deși apo- E determină în mare măsură viteza cu care sînt captate lipoproteinele, dirijarea acestora spre receptorii specifici se realizează mai ales prin intermediul celor două apoproteine B, astfel încît lipoproteinele exogene conținînd apo- B-48 se îndreaptă spre receptorii pentru resturile de chilomicroni, pe cînd cele din surse endogene se leagă de receptorii LDL datorită apo B-100.

Lipoproteinele captate de receptori pătrund împreună cu ei în interiorul celulei formînd microvezicule numite endozomi. Acest *proces de endocitoză mediată de receptori* se petrece în decurs de cîteva minute, timp în care prin acidifierea endozomilor se produce o desfacere a complexului lipoproteină-receptor. Receptorul astfel eliberat este reciclat spre suprafața celulei, înainte ca endozomul (vezicula conținînd lipoproteine) să fuzioneze cu lizozomii. În interiorul veziculei nou-constituite, particulele lipoproteice sînt supuse acțiunii unor hidrolaze care descompun apoproteinele pînă la stadiul de acizi aminați și hidrolizează esterii de colesterol eliberînd colesterol care urmează a fi utilizat pentru elabo-

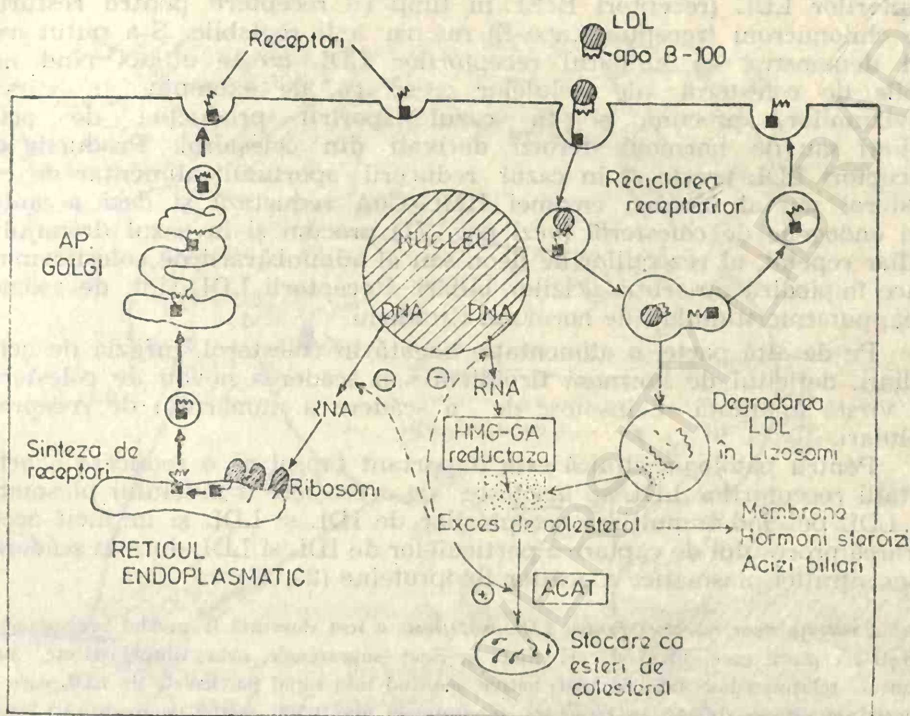


Fig. 1.10. Producţia de receptori pentru LDL (receptori B — 100/E) şi reglarea conţinutului de colesterol al celulelor. Receptorii produşi în reticulul endoplasmatic rugos ajung la suprafaţa celulei şi, după captarea particulelor de LDL sînt internalizaţi. Receptorii pot fi reciclaţi, în timp ce lipoproteinele captate şi internalizate sînt degradate în lizozomi. Colesterolul eliberat din LDL este utilizat la refacerea membranelor celulare precum şi la sinteza de acizi biliari (în ficat) sau de hormoni steroizi (în suprarenale şi gonade). Tendinţa de acumulare a colesterolului reduce sinteza de receptori şi reprimă HMG-CoA, reductaza activînd însă în mod direct acil-CoA-colesterol aciltransferaza (ACAT) şi implicit formarea esterilor de colesterol care reprezintă forma de stocare.

rarea de noi membrane. La nivelul unor celule specializate, colesterolul extras din LDL îndeplineşte şi alte roluri; în corticosuprarenală şi ovare el este convertit spre hormoni steroizi, iar în ficat va fi transformat în acizi biliari.

Cantitatea de colesterol eliberată din LDL într-o celulă este în măsură să moduleze metabolismul intracelular al colesterolului prin următoarele trei procese; 1) reduce sinteza de colesterol în celulă prin represia producţiei de HMG-CoA reductază, enzima cheie a biosintezei sterolilor (vezi pag. 25); 2) activează enzima acil-CoA-colesterol aciltransferază (ACAT) care reesterifică colesterolul cu acizi graşi făcînd posibilă stocarea lui sub formă de picături de esteri de colesterol; 3) declanşează un mecanism de feed-back negativ oprind elaborarea de noi receptori pentru LDL (fig. 1.10).

Posibilitatea reglării numărului de receptori este de o deosebită importanţă pentru homeostazia colesterolului şi pentru patologia metabolismului lipidic. Această reglare se exercită cu predominanţă la nivelul re-

ceptorilor LDL (receptori B/E), în timp ce receptorii pentru resturile de chilomicroni (receptorii apo-E) nu par a fi reglabile. S-a putut astfel demonstra că numărul receptorilor LDL crește atunci cînd nevoile de colesterol ale celulelor cresc, ca, de exemplu, în cursul diviziunilor, precum și în cazul sporirii producției de acizi biliari sau de hormoni steroizi derivați din colesterol. Producția de receptori LDL crește și în cazul reducerii aportului alimentar de colesterol sau al blocării enzimei HMG-CoA reductază și deci a sintezei endogene de colesterol (vezi pag. 71) precum şi în cazul drenajului biliar repetat, al rezecțiilor de ileon sau al administrării de colestiramină care împiedică absorbția acizilor biliari. Receptorii LDL sînt, de asemenea, puternic stimulați de hormonii tiroidieni.

Pe de altă parte, o alimentație bogată în colesterol, infuzia de acizi biliari, deficitul de hormoni tiroidieni sau scăderea nevoii de colesterol la vîrstă înaintată se însoțesc de o scădere a numărului de receptori celulari.

Pentru patologia clinică este important faptul că o reducere a activității receptorilor LDL se însoțește de o creștere a nivelului plasmatic al LDL pe cînd înmulțirea receptorilor de IDL și LDL și implicit accelerarea procesului de captare a particulelor de IDL și LDL duce la scăderea concentrației plasmatice a acestor lipoproteine (20, 21).

Existența unor receptori pentru LDL modificate a fost dovedită la nivelul macrofagelor. Acești receptori, care diferă de cei aflați în ficat, suprarenale, ovar, fibroblaşti etc., au o afinitate relativ redusă față de LDL native, captînd însă rapid particulele de LDL care au suferit anumite modificări în structura apoproteinei apo-B-100. Astfel de modificări interesează mai ales radicalii aminoacidului lizină care se pot acetila sau malonila (în contact cu acetoacetatul sau malondialdehida), glicozila (în cazul unei hiperglicemii diabetice) sau pot reacționa cu produşi de peroxidare ai acidului arahidonic generați în cursul activării plăcuțelor sanguine sau cu superoxizi produşi de leucocite şi/sau macrofage în cursul proceselor inflamatorii.

Deşi mecanismele amintite prezintă încă multe incertitudini, procesul de oxidare al LDL pare a contribui în mare măsură la formarea celulelor spumoase în cursul aterogenezei (vezi pag. 76).

Receptorii pentru HDL au fost demonstrați în hepatocite, suprarenale, ovare, testicule, fibroblaşti și celule musculare netede, recunoaşterea și legarea HDL realizîndu-se prin intermediul apoproteinelor E și A. Se pare că, de cele mai multe ori, HDL captate de receptori specifici nu sînt internalizate şi degradate ci, după o prealabilă preluare a unei anumite cantități de colesterol din membrana celulelor la nivelul cărora au fost captate, particulele de HDL se desprind și trec în circulație, favorizînd îndepărtarea excesului de colesterol din celule. De altfel, spre deosebire de receptorii LDL, numărul receptorilor HDL creşte în cazul supraîncărcării cu colesterol a celulelor (5). După cîteva astfel de recirculări particulele de HDL sînt captate și degradate mai ales în ficat.

I.2.2.3.4. *TRANSPORTUL DE LA ȚESUTURILE EXTRAHEPATICE SPRE FICAT*

Prevenirea încărcării excesive cu colesterol a celulelor implică existența unor mecanisme prin care colesterolul să fie scos din celule și dirijat spre ficat, unde are loc eliminarea sa ca atare sau sub formă de

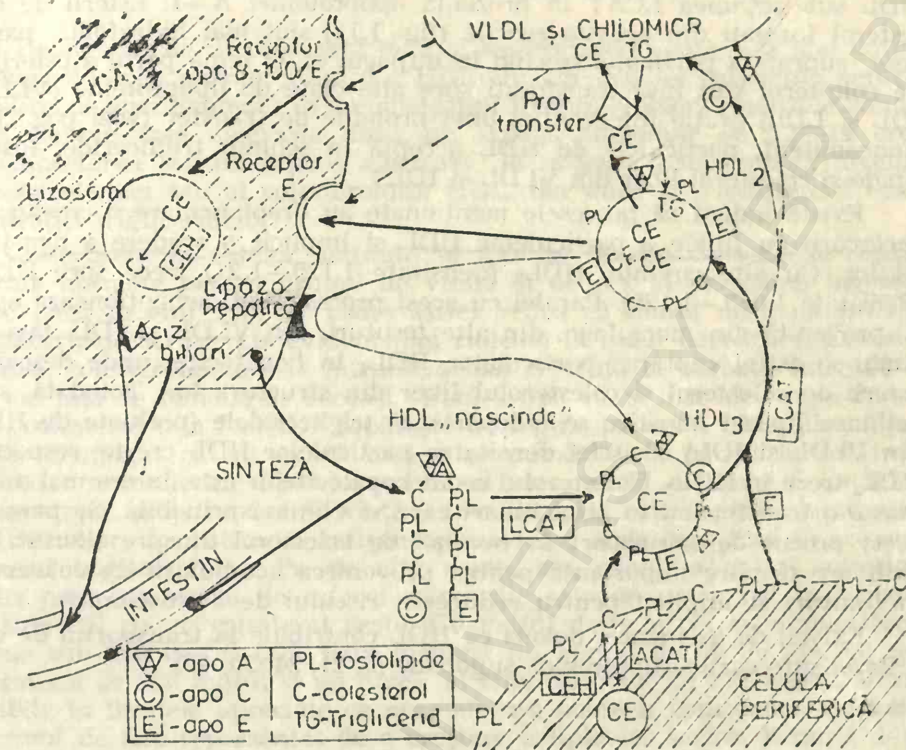


Fig. 1.11. Rolul HDL și LCAT în procesul de transport al colesterolului de la țesuturi la ficat (transport în revers). Se poate vedea că particulele discoidale de HDL „în stare născîndă" secretate de ficat și intestin devin sferice în timp ce colesterolul (C) se esterifică (CE) sub acțiunea LCAT, acești esteri trecînd în miezul hidrofob al particulei. Se creează astfel condiții ca HDL să preia colesterol liber din membranele celulelor periferice. Îmbogățirea cu colesterol și ulterior cu esteri de colesterol a HDL se însoțește și de achiziția de apo E de origine tisulară iar particulele astfel modificate ($HDL_3 \rightarrow HDL_2$) sînt captate de receptori la apo E eliberîndu-se astfel esterii de colesterol. În lizozomi CE→C sub acțiunea colesteril-esterhidrolazei (CEH). Colesterolul neesterificat se elimină prin bilă ca atare sau după o prealabilă transformare în acizi biliari. Este indicată, de asemeni, posibilitatea ca prin intermediul unei proteine de transfer o parte din CE să treacă în VLDL sau chilomicroni. În literatură se discută și posibilitatea unui transfer de trigliceride din VLDL spre HDL precum și posibilitatea reconvertirii HDL_2 spre HDL_3 sub acțiunea lipazei hepatice, aceste mecanisme ipotetice nefiind indicate în schema de mai sus.

acizi biliari. Un astfel de proces se realizează printr-un mecanism complex în care intervin HDL, enzima LCAT și proteina de transfer a esterilor de colesterol între diversele clase de lipoproteine (vezi fig. 1.11).

Datorită faptului că particulele de HDL recent secretate au în structura lor un procent mult mai scăzut de colesterol (și mai crescut de fosfolipide) decît membranele celulare, particulele amintite captează cu ușurință colesterolul de la suprafața celulelor. Întrucît urmarea captării colesterolului celular este creșterea raportului colesterol/fosfolipide din HDL, capacitatea acestor particule de a capta colesterol ar fi mult diminuată dacă nu ar interveni activitatea de esterificare a colesterolului din

HDL sub acțiunea LCAT în prezența apoproteinei A—I. Esterii de colesterol formați din această reacție (fig. 1.11) sînt mai hidrofobi, părăsesc suprafața particulei trecînd în mijlocul ei. O bună parte a esterilor de colesterol sînt însă transferați spre alte clase de lipoproteine (VLDL, IDL și LDL) grație intervenției unei proteine de transfer (vezi pag. 34). Concomitent, particulele de HDL acceptă în schimb trigliceride, fosfolipide și colesterol liber din VLDL și IDL.

Există indicii că procesele menționate au drept urmare o creștere a încărcării cu lipide a particulelor HDL și implicit o scădere a densității lor. Cu alte cuvinte, HDL_3 (densitate 1,125—1,21) trece spre HDL_2 (densitate 1,063—1,125). Paralel cu acest proces, HDL achiziționează apo-E, provenită din macrofage, din alte țesuturi, din VLDL și IDL, favorizîndu-se astfel captarea particulelor HDL_2 în hepatocite, unde descarcă esterii de colesterol și colesterolul liber din structura lor. Totodată, sub acțiunea lipazei hepatice se îndepărtează trigliceridele (preluate de HDL din VLDL și IDL) și astfel densitatea particulelor HDL crește, respectiv HDL_2 trece în HDL_3. Colesterolul cedat hepatocitelor este, în cea mai mare măsură, transformat în acizi biliari care se elimină prin bilă. Se pare că acest proces de „transport în revers" de colesterol dinspre țesuturi la ficat are o mare importanță pentru prevenirea acumulării de colesterol în țesuturi și implicit pentru reducerea riscului de ateroscleroză.

Există, de asemenea, dovezi că HDL contribuie la transportul de colesterol spre corticosuprarenale și gonade (5, 21, 24, 25, 45).

I.3. EXPLORAREA METABOLISMULUI LIPIDIC ÎN LABORATORUL CLINIC

Explorarea metabolismului lipidic în condițiile laboratorului clinic vizează următoarele obiective majore:

a) Depistarea unei hipo- sau hiperlipoproteinemii;

b) Încadrarea anomaliei într-un anumit tip;

c) Stabilirea caracterului primar sau secundar al anomaliei;

d) Precizarea mecanismelor prin care s-a ajuns la perturbarea metabolismului lipidic;

e) Evaluarea potențialului eterogen sau a altor implicații patogenice ale anomaliei respective;

f) Investigații complementare privind alte particularități metabolice sau de hemostază cu potențial patogen;

Este evident că atingerea acestor obiective este posibilă doar printr-o strînsă colaborare între clinicieni și specialiștii din laborator. Mijloacele care stau astăzi la îndemîna laboratorului în vederea explorării metabolismului lipidic prezintă o complexitate variată, de la o simplă determinare de colesterol și pînă la studii de cinetică a lipoproteinelor plasmatice, bazate pe metode radioizotopice. Din acest motiv, este necesară o ierarhizare a metodelor de investigare care trebuie efectuate în etape.

I.3.1. ETAPA ANALIZELOR DE ORIENTARE (SCREENING)

Determinările de colesterol total și trigliceride la care s-ar mai putea adăuga dozarea colesterolului din HDL sînt, de regulă, suficiente pentru depistarea unei anomalii în metabolismul lipoproteinelor. Analizele amintite trebuie însă efectuate după un repaos alimentar de 12—14 ore. Nerespectarea acestui repaos afectează în măsură neînsemnată nivelul colesterolemiei sau al colesterolului HDL, dar duce la o creștere a concentrației trigliceridelor.

Interpretarea datelor obținute se face în funcție de valorile considerate normale pentru grupul de vîrstă și de sex al persoanei investigate (vezi tabelul 1.3). Se poate astfel vedea că limita normală pentru trigliceridele serice este evident mai ridicată în cazul bărbaților. De asemenea, colesterolemia este întrucîtva mai crescută la bărbații între 20—40 ani față de femeile de aceeași vîrstă. După 40, și mai ales după 50 de ani, colesterolemia femeilor depășește de regulă pe cea a bărbaților. Trebuie menționat că nu există încă o unanimitate de păreri în privința valorilor normale ale lipidelor serice al căror nivel depinde și de felul alimentației și de modul de viață într-o anumită colectivitate, iar în cazul femeilor, de utilizarea anticoncepționalelor orale care tind să crească nivelul trigliceridelor. Pe de altă parte, așa cum s-a arătat anterior (vezi pag. 14), riscul de infarct miocardic este de patru ori mai mare la subiecții cu un colesterol peste 270 mg/dl decît la cei cu o colesterolemie sub 200 mg/dl (27). Prin urmare, un bărbat de 50 de ani, cu un colesterol de 250 mg/dl și un nivel al trigliceridelor de 230 mg/dl, încadrabile în limitele apreciate ca normale, nu poate fi considerat lipsit de factorul de risc reprezentat de o creștere a lipidelor serice. Rezultă deci că valorile colesterolemiei pot fi considerate ca optime doar atunci cînd sînt sub 200 mg/dl (5,2 mmol/l), iar în cazul trigliceridelor sub 140 mg/dl (1,6 mmol/l) (45). De notat că nivelul trigliceridelor este, de regulă, crescut la persoanele cu supragreutate (38).

Atunci cînd se constată o hiper- sau o hipolipemie se recomandă efectuarea electroforezei în gel de agaroză a lipoproteinelor spre a preciza care clasă de lipoproteine este afectată. Valorile normale ale fracțiunilor electroforetice variază între 25—35% pentru alfalipoproteine, 15—25% pentru fracțiunea prebeta și între 45—55% în cazul betalipoproteinelor. Interpretarea foreogramei lipoproteinelor serice se poate face însă doar atunci cînd se cunosc valorile trigliceridelor și colesterolului. Așa, de exemplu, constatarea unei creșteri a fracțiunii prebeta în condițiile unor valori normale ale trigliceridelor poate fi doar uneori considerată ca expresie a prezenței Lp (a) (vezi pag. 17), și deci nu are încă o semnificație patologică certă. Examinările amintite sînt totodată în măsură să stabilească tipul de hiperlipoproteinemie (vezi pag. 52).

În literatura de specialitate se dau și valorile normale pentru colesterolul din diversele clase de lipoproteine. Pentru populația adultă, valorile HDL-colesterolului sînt de 31—70 mg/dl la bărbați și de 39—85 mg/dl la femei; colesterolul din fracțiunea VLDL (prebeta) oscilează între 6—49 mg/dl la bărbați și 3—39 mg/dl la femei, în timp ce LDL colesterolul se situează între 70—190 mg/dl la bărbați și 60—200 mg/dl la femei (4). În principiu, aceste valori diferențiate ale colesterolului ar

Tabelul 1.3

Concentrațiile normale de lipide serice în funcție de vîrstă și sex. Limitele au fost obținute prin calculul frecvenței cumulative. Conform acestui procedeu, 10% din subiecții unei populații investigate, care au prezentat valorile cele mai joase și 10% din subiecții prezentînd, valorile cele mai ridicate au reprezentat grupurile anormale de hipo- și, respectiv, hiperlipemii. Valoarea cea mai joasă și respectiv cea mai ridicată întîlnite la restul subiecților reprezintă limitele valorilor normale (așa-zisele 10th percentile și 90th percentile). Datele pentru populația infantilă au fost preluate după Schaefer și Levy (45), iar cele ale adulților au fost adaptate pe baza cercetărilor epidemiologice efectuate la populația din județul Cluj. Transformarea colesterolului și trigliceridelor din mg/dl în mmol/l se face înmulțindu-se cu factorii 0,0259 și respectiv 0,0114.

	Bărbați				Femei			
	Colesterol		Trigliceride		Colesterol		Trigliceride	
Vîrsta	mg/dl	mmol/l	mg/dl	mmol/l	mg/dl	mmol/l	mg/dl	mmol/l
0—9 ani	125—190	3,24—4,92	33—84	0,37—0,96	120—195	3,11—5,05	38—96	0,43—1,09
10—19 "	127—190	3,28—4,92	33—102	0,37—1,16	126—190	3,26—4,92	44—114	0,50—1,29
20—29 "	130—227	3,37—5,88	54—190	0,61—2,16	130—209	3,37—5,41	41—116	0,46—1,32
30—39 "	150—240	3,88—6,22	60—245	0,86—2,79	139—210	3,66—5,59	44—137	0,50—1,56
40—49 "	160—245	4,41—6,35	65—240	0,74—2,74	147—235	3,81—6,08	51—171	0,58—1,95
50—59 "	165—250	4,27—6,47	66—230	0,75—2,62	170—268	4,40—6,94	59—190	0,67—2,16
60—69 "	168—240	4,35—6,22	60—220	0,68—2,51	180—275	4,66—7,12	64—200	0,73—2,28
70 "	168—230	4,01—5,96	55—190	0,63—2,16	170—270	4,40—6,99	69—200	0,78—2,28

trebui obținute prin separarea lipoproteinelor în clase cu ajutorul ultracentrifugării preparative urmată de dozarea enzimatică a colesterolului în fiecare clasă. În practică, valorile HDL colesterolului se pot obține însă cu suficientă acuratețe dozîndu-le în supernatantul rămas după precipitarea VLDL și LDL; atunci cînd nivelul trigliceridelor nu depășește 400 mg/dl (4,5 mmol/l) și se pot exclude tipurile III și V de hiperlipoproteinemie, VLDL colesterolul este de aproximativ 1/5 din concentrația trigliceridelor serice exprimate în mg/dl. Într-o astfel de situație, LDL colesterol = colesterol total — (VLDL colesterol + HDL colesterol).

I.3.2. ETAPA ANALIZELOR COMPLEMENTARE

În ultimii ani se acordă o importanță crescîndă valorii diagnostice a *determinărilor de apoproteine*. O astfel de determinare se bazează fie pe metode imunologice, fie pe electroforeza în gel de poliacrilamidă a apoproteinelor obținute prin delipidarea prealabilă a lipoproteinelor izolate prin ultracentrifugare. Se consideră că nivelul plasmatic al apoproteinei A—1 (principala apoproteină din HDL) și de apoproteină B (apoproteina din LDL), sau mai precis scăderea raportului apo- A—1/apo B, reflectă mai fidel riscul pentru ateroscleroză coronariană decît determinările de colesterol total, HDL colesterol, LDL colesterol sau de trigliceride (18). Se poate deci presupune că determinările de apoproteine vor deveni în scurt timp analize de uz curent. Reamintim că determinările de apoproteine ar putea contribui la elucidarea unor anomalii de metabolism lipidic. Așa de exemplu, unele hipertrigliceridemii severe sînt cauzate de un deficit de apo C—II, despre care se știe că reprezintă un cofactor al lipoproteinlipazei. Anomalii în structura apo E sînt, de asemenea, asociate cu acumularea de beta VLDL, caracteristică hiperlipoproteinemiei tip III (45).

Recent se insistă asupra importanței determinărilor de Lp (a), care deși, de regulă, este mai crescută la subiecții hiperlipemici, poate prezenta nivel plasmatic ridicat și la cei normolipemici și reprezintă un factor de risc independent (vezi pag. 17).

O contribuție esențială la înțelegerea metabolismului lipidic au adus-o studiile privind *procesele de reîmprospătare (turn-over) ale lipoproteinelor plasmatice*. Astfel de studii implică marcare prealabilă *in vitro* cu ^{125}I a lipoproteinelor separate prin ultracentrifugare. Acestea sînt apoi injectate în circulația subiectului investigat, urmărindu-se timpul de înjumătățire biologică a lipoproteinelor radioactive. S-a putut astfel stabili că în hipercolesterolemia familială (tip II-a), timpul de înjumătățire a LDL este aproximativ de 2 ori mai lung decît la normali.

Marcarea cu ^{125}I interesează mai ales apoproteinele, respectiv apo B. Pentru marcarea trigliceridelor este nevoie să se administreze subiectului acizi grași marcați sau mai bine glicerol marcat care se incorporează *in vivo* în trigliceridele din VLDL. Se urmărește apoi dispariția progresivă a radioactivității din trigliceridele plasmatice. Pentru urmărirea vitezei de remaniere a colesterolului se injectează ^{14}C-colesterol sau ^{3}H-colesterol, urmărindu-se în continuare scăderea radioactivității plasmatice și apariția radioizotopului în acizii biliari sau în sterolii din bilă și scaun.

Admițîndu-se că, în condiții de echilibru metabolic, respectiv în lipsa unor fluctuații importante ale nivelului plasmatic al lipoproteinelor, viteza de îndepărtare a diferitelor con-

ponente ale acestora este egală cu viteza de sinteză și de secreție, se pot face evaluări asupra mecanismelor care au dus la hiperlipemie. Așa de exemplu, în cazul unei hiperlipemii evoluînd cu o viteză de îndepărtare redusă (turn-over încetinit), se poate presupune că nivelul crescut al lipidelor este o consecință a dereglării uneia din etapele procesului de catabolizare a lipoproteinelor. Pe de altă parte, dacă în ciuda unei viteze de reîmprospătare accelerată există un oarecare grad de hiperlipemie, se poate afirma că producția excesivă de lipoproteine constituie principalul mecanism patogenetic (38).

În figurile 1.12 și 1.13 este reprodus principiul metodelor de determinare a proceselor de turn-over și modul de interpretare a rezultatelor unor astfel de investigații.

Urmărirea *metabolismului acizilor biliari*, folosindu-se în acest scop ^{14}C-acid colic și ^{3}H-acid chenodeoxicolic, poate, de asemenea, furniza informații asupra soartei colesterolului. S-a putut astfel arăta că în hipercolesterolemia familială (tip II-a) formarea de acid colic pe seama colesterolului este scăzută față de normal, pe cînd la bolnavii cu hipertrigliceridemie endogenă (tip II-b sau IV), accelerarea proceselor de turn-over și sinteză a lipoproteinelor se asociază cu o viteză crescută a sintezei de acid colic (16 b).

Determinările diferențiate de colesterol liber și esterificat ca și dozarea fosfolipidelor totale sau pe fracțiuni au importanță redusă pentru stabilirea riscului de ateroscleroză. Scăderea raportului între esterii de colesterol și colesterolul liber se constată însă în insuficiența hepatică severă și în colestază, atingînd valori extrem de joase în deficitul familial de LCAT (vezi pag. 65).

Colestaza și deficitul familial de LCAT evoluează și cu importante creșteri ale fosfolipidelor (mai ales lecitină), iar nivelul concomitent crescut de colesterol liber și de lecitină produce modificări în structura lipoproteineor care realizează, în unele cazuri, aspectul descris ca lipoproteină X (vezi pag. 19).

Studiul unor enzime plasmatice implicate în metabolismul lipidelor contribuie, în mare măsură, la elucidarea mecanismelor patogenice. Așa, de exemplu, constatarea unei valori scăzute a *activității lipoproteinlipazei*, respectiv a activității lipolitice postheparinice a plas-

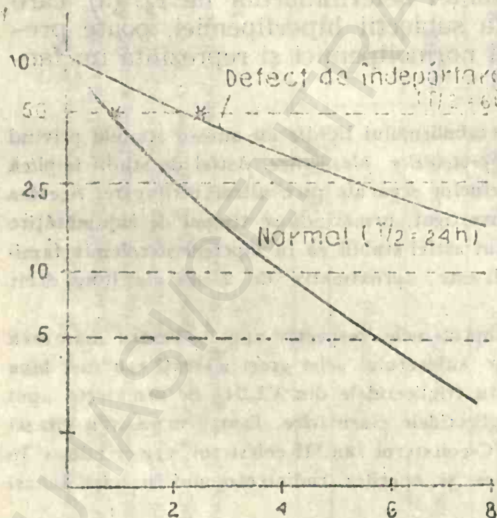


Fig. 1.12. Principiul determinării proceselor de reîmprospătare (turn-over) ale lipoproteinelor sau a diverselor lor componente. Pe abscisă: timpul în zile de la injectarea lipoproteinelor marcate, pe ordonată: procentul din radioactivitatea rămasă în circulație (reprezentare logaritmică). Se observă că timpul de înjumătățire ($T_{1/2}$) este prelungit la un subiect care prezintă o perturbare a proceselor de îndepărtare a lipoproteinelor din plasmă. Prin marcarea cu ^{125}I a apoproteinei B din LDL se poate evalua $T_{1/2}$ al acestei lipoproteine. În cazul marcării *in vivo* a trigliceridelor cu glicerol marcat și reinjectării în circulație a VLDL astfel marcate se pot obține relații asupra vitezei *de îndepărtare a trigliceridelor din VLDL*. Viteza procesului de turn-over se calculează după formula: Turn-over rate (mg/h/kg greutate) $= \frac{0,693 \times \text{volum plasmatic}}{T_{1/2}\text{ (ore)}} \times$

$$\times \frac{\text{concentrație în plasmă}}{\text{greutate corporală (kg)}}$$

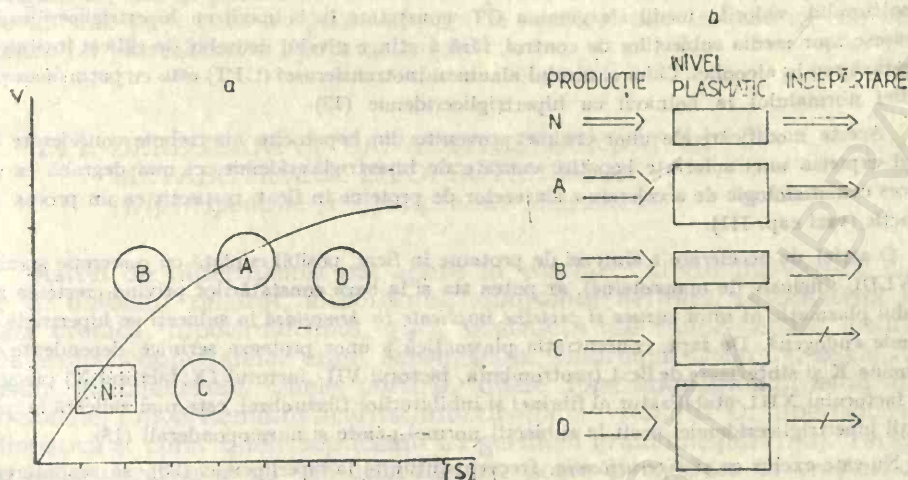


Fig. 1.13. Evaluarea diverselor posibilități de producere a unei hiperlipemii (în cazul de față hipertrigliceridemie).
a) corelație între concentrația trigliceridelor plasmatice [S] pe abscisă și viteza de sinteză *(V)* a VLDL
b) variatele posibilități de asociere între viteza de sinteză a trigliceridelor și posibilitățile de îndepărtare a lor din circulație. Avîndu-se în vedere capacitatea limitată (saturabilă) de îndepărtare a trigliceridelor din plasmă, creșterea vitezei de sinteză se însoțește de regulă de o creștere a concentrației lor plasmatice (grupul A alcătuit din majoritatea subiecților cu hiperlipemie tip IV). Există însă și situații în care sinteza accelerată se însoțește de o amplificare a posibilităților de îndepărtare, astfel încît nivelul plasmatic al trigliceridelor se modifică doar în mică măsură (grupul B incluzînd unele cazuri de obezitate, de hipertiroidism sau în cazul femeilor care folosesc anticoncepționale orale). Deficitul de îndepărtare (grupul C) predomină în cazurile de hipotiroidism și în unele cazuri de hipertrigliceridemie familială (tip I sau tip V, vezi pag. 52). Asocierea unei sinteze accelerate cu un deficit de îndepărtare al trigliceridelor (grupul D) este caracteristică sindromului nefrotic sau unor cazuri cu anomalii poligenice ale metabolismului trigliceridelor. Adaptare după datele din literatură (38,45). N = subiecți normali.

mei (vezi pag. 27), sugerează că o hiperlipemie este cauzată, în primul rînd, de defectul de hidroliză a trigliceridelor din chilomicroni sau VLDL.

Determinările de *lecitincolesterolaciltransferază* (LCAT) se practică rareori în laboratorul clinic. Această enzimă secretată de ficat și avînd drept efect esterificarea colesterolului plasmatic (vezi pag. 34 și fig. 1·8) scade în insuficiența hepatică și lipsește cu desăvîrșire în deficitul genetic de LCAT (14, 39). Este interesant de semnalat că activitatea LCAT crește la subiecții cu hiperlipoproteinemie tip II -b și IV, activitatea enzimei fiind oarecum paralelă cu viteza de sinteză și de reîmprospătare (turn-over) a colesterolului și respectiv a esterilor de colesterol. De altfel, activitatea LCAT este, în mare măsură, paralelă cu cea a *pseudo-colinesterazei serice* (CHE), o enzimă de secreție hepatică cu posibile implicații în metabolismul lipidic, respectiv în scindarea esterilor colinei cu acizi grași (10). Spre deosebire de dificultățile tehnice întîmpinate de dozarea LCAT, determinarea CHE constituie o analiză de rutină care poate furniza relații indirecte asupra vitezei de sinteză a lipoproteinelor. Există chiar studii după care scăderea raportului HDL colesterol/CHE sau apo A—I/CHE este în măsură să diferențieze bolnavii coronarieni de subiecții sănătoși (30).

Creșterea marcată a *gamma-glutamiltransferazei (gamma GT)* la un bolnav cu hiperlipemie atrage atenția asupra alcoolismului cronic sau a unui proces de colestază. Chiar și în lipsa

alcoolismului, valorile medii ale gamma GT, constatate la bolnavii cu hipertrigliceridemie, depăşesc uşor media subiecţilor de control, fără a atinge nivelul deosebit de ridicat întîlnit în colestază sau la alcoolici. Chiar şi nivelul alaninaminotransferazei (GPT) este cu puţin deasupra mediei normalului la bolnavii cu hipertrigliceridemie (13).

Aceste modificări ale unor enzime provenite din hepatocite nu trebuie considerate ca fiind expresia unei suferinţe hepatice cauzate de hipertrigliceridemie, ci mai degrabă ca un proces cvazifiziologic de accelerare a sintezelor de proteine în ficat, respectiv ca un proces de inducţie (vezi cap. III).

O astfel de accelerare a sintezei de proteine în ficat, posibil cuplată cu o secreţie sporită de VLDL (inclusiv de apoproteine), ar putea sta şi la baza constatărilor privind creşterea nivelului plasmatic al unor *enzime şi proteine implicate în hemostază* la subiecţi cu hipertrigliceridemie endogenă. De fapt, concentraţia plasmatică a unor proteaze serinice dependente de vitamina K şi sintetizate de ficat (protrombina, factorul VII, factorul IX, factorul X) precum şi a factorului XIII, stabilizator al fibrinei şi inhibitorilor fibrinolizei, este mai ridicată la pacienţii hipertrigliceridemici decît la subiecţii normolipemic şi normoponderali (15).

Nu este exclus ca şi *hiperuricemia*, frecvent întîlnită la hiperlipemici (23), să se datoreze tot unei sinteze accelerate.

De asemenea, frecventa asociere a supragreutăţii cu diabetul şi hiperlipemia face necesară *explorarea metabolismului glucidic* la orice hiperlipemie (toleranţă la glucoză, insulinemie).

Dozările de microelemente (Mg, Cu, Zn, Mn) au devenit astăzi posibile graţie spectroscopiei de absorbţie atomică.

Astfel de investigaţii efectuate în diverse tipuri de hiperlipemii nu au reuşit să treacă de etapa analitică, iar rezultatele obţinute nu au adus încă argumente suficient de convingătoare cu privire la rolul microelementelor în patogeneza hiperlipoproteinemiilor. De fapt, unele variaţii ale nivelului plasmatic al microelementelor semnalate în literatură la hiperlipemici s-ar putea datora vîrstei înaintate, leziunilor vasculare sau terapiei cu diuretice a acestor bolnavi care adeseori sînt şi hipertensivi.

Subliniem însă că la ora actuală, motodele laboratorului clinic se limitează la investigaţiile care pot fi efectuate în plasmă, urină şi fecale şi nu au încă posibilitatea de a evalua, în mod direct, procesele enzimatice care se petrec în interiorul celulelor şi în care microelementele ar putea juca un rol însemnat.

I.4. ANOMALII ALE LIPOPROTEINELOR

Diversele anomalii ale metabolismului lipidic se întîlnesc cu mare frecvenţă. Pentru practica medicală şi respectiv pentru stabilirea riscului de ateroscleroză creşterea nivelului plasmatic al lipoproteinelor, respectiv hiperlipoproteinemiile, prezintă o importanţă majoră. Laboratorul poate însă depista şi cazuri de hipolipoproteinemie sau de anomalii în compoziţia lipoproteinelor care nu sînt lipsite de interes pentru patologia clinică.

Atît hiper- cît şi hipolipoproteinemiile pot avea un caracter primar sau secundar. Cunoaşterea stărilor patologice care pot duce la dereglări, cu caracter secundar, ale metabolismului lipoproteinelor au importanţă nu numai spre a diferenţia astfel de dereglări de anomaliile cu caracter

congenital, dar și pentru că studiul lor poate contribui la elucidarea unor mecanisme prin care se poate ajunge la creșteri sau la scăderi ale concentrației plasmatice a lipoproteinelor.

I.4.1. DEREGLĂRI CU CARACTER SECUNDAR ÎN METABOLISMUL LIPOPROTEINELOR *(Hiperlipemiile și hipolipemiile secundare)*

Astfel de hiperlipemii pot apare în condiții extrem de variate cum ar fi: diabetul zaharat, alcoolismul, sindromul nefrotic, insuficiența renală cronică, hipotiroidismul, guta, obstrucții ale căilor biliare, utilizarea anticoncepționalelor orale, acromegalia, sindromul Cushing, boala Addison, glicogenozele, unele porfirii, unele hiperimunoglobulinemii monoclonale, lupoeritematoviscerita, intoxicația cu vitamina D, hipercalcemia idiopatică și chiar unele septicemii cu germeni grammnegativi (9). Terapia cu beta-blocante și cu hidroclorotiazide poate și ea duce la creșteri ale lipidelor serice (45). Avîndu-se în vedere multitudinea acestor situații cît și faptul că hiperlipoproteinemiile primare sînt relativ frecvent întîlnite, există și posibilitatea asocierii întîmplătoare între bolile amintite și o anomalie genetică de metabolism lipidic. Din acest motiv, termenul de hiperlipemie secundară se poate aplica doar atunci cînd tratamentul adecvat al bolii de bază influențează în mod evident nivelul lipidelor serice, iar rudele apropiate nu prezintă hiperlipemie.

În cele ce urmează sînt analizate doar cîteva hiperlipoproteinemii secundare mai frecvent întîlnite sau care ridică probleme deosebite sub aspectul patogenezei.

I.4.1.1. HIPERLIPEMIA DIN DIABETUL ZAHARAT

Caracterul cert secundar al unei hiperlipemii survenite la un diabetic poate fi susținut doar la cazurile de diabet necontrolat, cu deficit sever de insulină și evoluînd cu acidocetoză. În astfel de cazuri se ajunge la o hipertrigliceridemie accentuată, cu creșterea fracțiunii prebeta și a chilomicronilor, iar mecanismul patogenetic principal pare a fi reprezentat de o exagerare a mobilizării de AGL din țesutul adipos și de un deficit important în procesul de îndepărtare a trigliceridelor din plasmă. Chiar și în condițiile menționate gradul de hiperlipoproteinemie variază de la caz la caz. Se poate presupune că hipertrigliceridemia este mai severă atunci cînd decompensarea diabetului survine la un subiect obez sau cu un deficit minor genetic, preexistent, al mecanismelor care asigură îndepărtarea trigliceridelor din plasmă.

La restul cazurilor de diabet zaharat și în special la cele cu diabet tip II (noninsulinodependent), legătura cauzală între perturbarea metabolismului glucidic și hiperlipemie este mai greu de stabilit. În primul rînd, nu toți diabeticii ci doar aproximativ 25% dezvoltă hiperlipemii evidente. În al doilea rînd, nu se poate stabili o legătură între gradul de intoleranță la hidrați de carbon și nivelul lipidelor serice. Nu este

astfel exclus ca aceiaşi factori, ca de exemplu obezitatea, tipul de alimentaţie sau alterări în dinamica secreţiei de insulină să condiţioneze atît apariţia diabetului zaharat clinic manifest, cît şi dezvoltarea unui anumit grad de hiperlipemie. Nu rareori astfel de diabetici cu supragreutate şi hiperlipemie sînt şi hipertensivi şi prezintă hiperuricemie, dar mecanismele care duc la apariţia acestor boli asociate (35) sau a aşa-zisului sindrom metabolic (23) sînt încă puţin elucidate.

I.4.1.2. HIPERLIPEMIA DIN SINDROMUL NEFROTIC

Sindromul nefrotic se însoţeşte, în marea majoritate a cazurilor, de o evidentă hiperlipoproteinemie caracterizată în primul rînd de creşterea colesterolemiei şi adeseori de o creştere concomitentă a trigliceridelor şi fosfolipidelor. Analiza detaliată evidenţiază o creştere importantă a LDL colesterolului şi a apoproteinei B, asociată cu o creştere a VLDL, realizînd, de cele mai multe ori, fenotipul IIb (vezi pag. 59). Nu sînt rare nici cazurile în care predomină hipertrigliceridemia, realizîndu-se aspectele fenotipului IV şi V. Aceste modificări sînt corelate cu gravitatea proteinuriei şi tind să revină spre normal atunci cînd survine o remisiune a sindromului nefrotic sau cînd hipoalbuminemia este corectată prin infuzie de albumină. Astfel de observaţii denotă că hiperlipoproteinemia nefroticilor este secundară pierderii de proteine pe cale renală. Hipoalbuminemia şi respectiv scăderea presiunii coloidosmotice a plasmei reprezintă un puternic stimul pentru accelerarea sintezei de proteine şi lipoproteine în ficat. Pe de altă parte, creşterea cu predominanţă a LDL, ca şi unele neconcordanţe între gradul hiperlipoproteinemiei şi nivelul colinesterazei serice, un indicator al sintezei hepatice de proteine (care nu se pierde prin urină), atrage atenţia asupra mecanismelor complexe implicate în producerea hiperlipemiei nefroticilor. S-ar părea deci că aceste mecanisme includ nu numai o producţie accelerată de lipoproteine dar şi un oarecare deficit de catabolizare a lor (9).

Mai puţin elucidate sînt cauzele care duc la creşterea lipidelor serice la bolnavii cu insuficienţă renală cronică evoluînd fără sindrom nefrotic. La cazurile supuse la dializă cronică, s-a incriminat deficitul de carnitină (1), un compus care favorizează pătrunderea acizilor graşi prin membrana internă a mitocondriilor, unde are loc oxidarea lor (vezi pag. 31). Limitarea acestui proces face ca o mai mare proporţie a acizilor graşi mobilizaţi din ţesutul adipos să fie utilizaţi pentru sinteză de trigliceride în ficat.

I.4.1.3. HIPERLIPEMIA ALCOOLICILOR

În multe cazuri de alcoolism se constată o creştere a trigliceridelor şi a fracţiunii electroforetice prebeta (VLDL). Se consideră că în astfel de cazuri preexistă un deficit de îndepărtare a trigliceridelor din plasmă, iar pe acest fond modificările induse de alcool în metabolism (creşterea mobilizării de AGL, încetinirea oxidării acizilor graşi) duc la creşterea trigliceridelor serice. Alcoolismul cronic se însoţeşte, de regulă, de o creş-

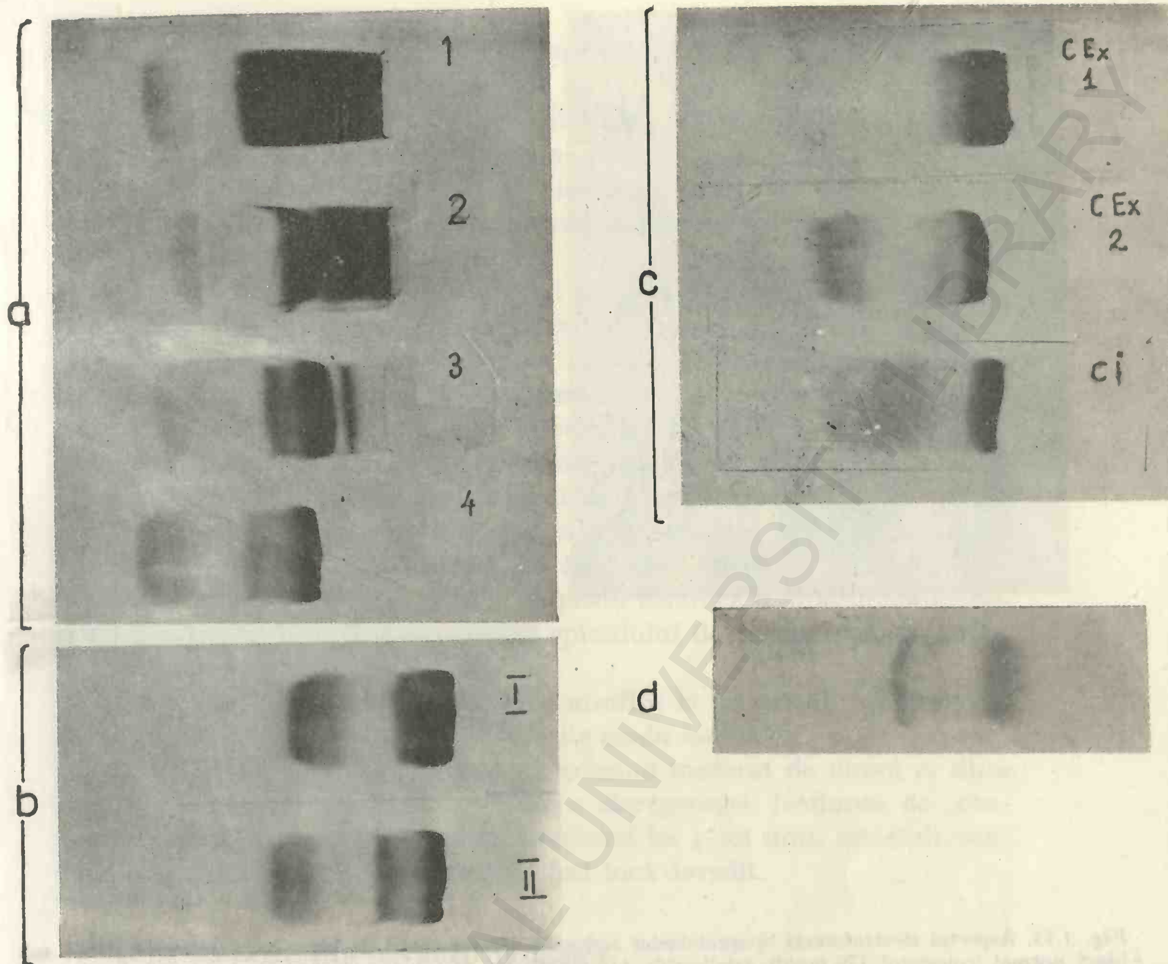


Fig. 1.14. Anomalii cu caracter secundar ale lipoproteinelor serice: a) Evoluţia spectrului lipoproteinelor serice într-un caz de pancreatită acută la un alcoolic: 1) în primele 24 ore (trigliceridele 40 mmol/l — 3 500 mg/dl); 2) la 48 ore de la debutul pancreatitei (trigliceride 17 mmol/l — 1487 mg/dl); în ziua a 3-a (trigliceride 6 mol/l — 525 mg/dl); 4) după 14 zile (trigliceride 2 mmol/l — 174 mg/dl). Normalizarea tipului V de hiperlipemie este precedată de aspecte intermediare caracterizate printr-o fracţiune beta lărgită şi apariţia unei benzi relativ bine delimitate cu migrare postbeta. Scăderea nivelului trigliceridelor decurge după o pantă logaritmică. b) Comportarea lipoproteinelor serice la un caz de hipotiroidism. I înainte şi II după 3 săptămîni de tratament cu hormoni tiroidieni. Colesterolemia scade de la 360mg//dl la 220 mg/dl. c) Anomalii ale lipoproteinelor serice în cursul colestazei *CExI* — colestază extrahepatică la un bolnav cu carcinom de cap de pancreas. De observat apariţia unei benzi cu migrare post beta şi care s-a dovedit a fi lipoproteina X. *CExII* — normalizarea lipidogramei bolnavului la 6 săptămîni de la efectuarea unei anastomoze biliodigestive. *CI* — colestază intrahepatică (ciroză biliară) evoluînd cu apariţia unor alfa lipoproteine cu migrare întîrziată. d) hipobetalipoproteinemie secundară la un bolnav cu un sindrom de malabsorbţie survenit în urma unui limfom al plăcilor Peyer.

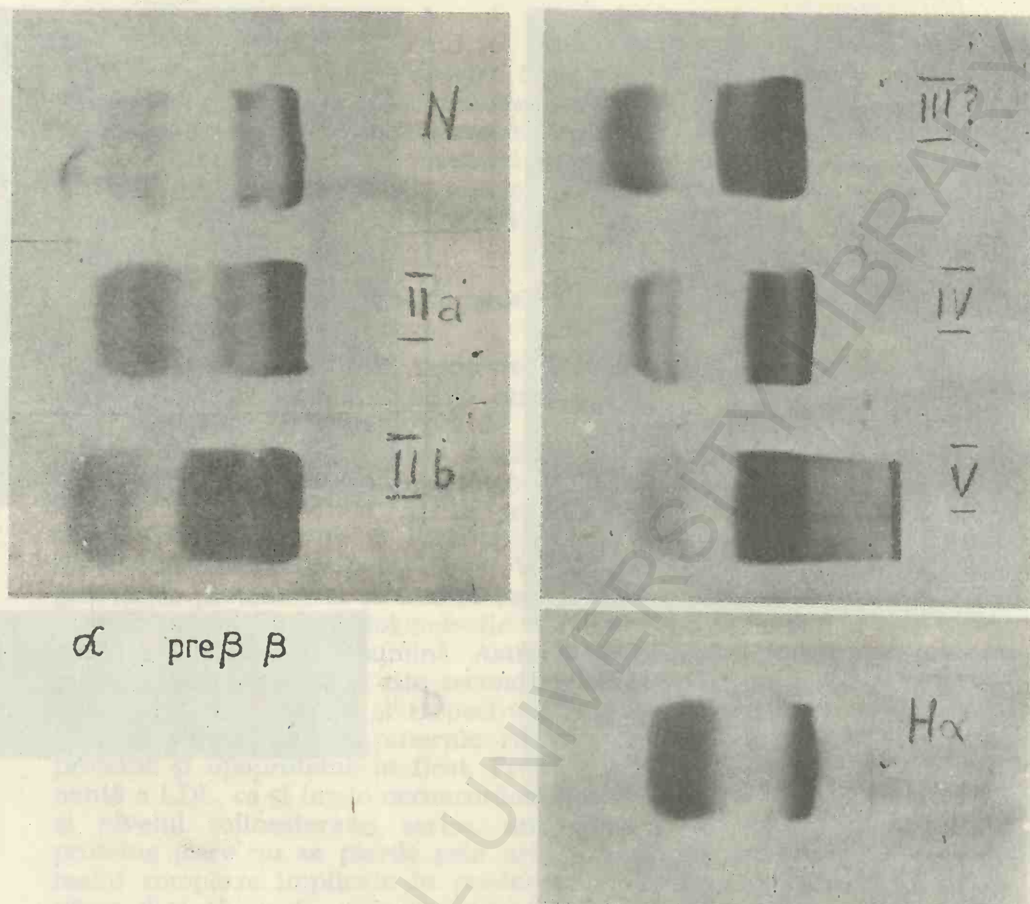


Fig. 1.15. Aspectul electroforezei lipoproteinelor serice în diverse tipuri de hiperlipoproteinemii: N — subiect normal (colesterol 176 mg/dl, trigliceride 116 mg/dl) tip II-a heterozigot (colesterol 386 mg/dl, trigliceride 134 mg/dl); II-b (colesterol 340 mg/dl, trigliceride 286 mg/dl); tip III (colesterol 536 mg/dl, grigliceride 398 mg/dl) — confirmarea acestui tip de hiperlipemie necesită dozarea colesterolului din beta-VLDL, raportul colesterol/trigliceride fiind întotdeauna > 0,30, în timp ce, la normali, acest raport este sub 0,251; tip IV (colesterolul 266 mg/dl, trigliceride 400 mg/dl); tip V (colesterol 360 mg/dl, trigliceride 1 080 mg/dl). Se prezintă şi un aspect (H alfa) depistat incidental la un subiect sănătos clinic, în vîrstă de 60 de ani, care prezenta o creştere pronunţată a alfa-lipoproteinelor (HDL colesterol 97 mg/dl).

tere a activității gamma-glutamiltransferazei (γGT), o enzimă inductibilă produsă în hepatocite. Este interesant de semnalat că nivelul acestei enzime este deosebit de ridicat la acei alcoolici care dezvoltă hiperlipemie.

Adeseori alcoolicii prezintă și un oarecare grad de hiperuricemie.

Uneori, după un puseu acut de alcoolism, plasma poate deveni lactescentă, iar această hipertrigliceridemie severă se însoțește de creșteri ale fosfolipidelor și colesterolului liber. În cazuri mai rare, astfel de hiperlipemii evoluează cu anemie hemolitică și icter, atari manifestări, apărute la alcoolici cu ficat grăsos, alcătuiesc sindromul Zieve.

Hipertrigliceridemia constatată în 10—20% din cazurile de pancreatită acută survine, de regulă, în legătură cu abuzul de alcool și de lipide alimentare iar o bună parte a subiecților care dezvoltă astfel de manifestări pancreatice asociate cu hipertrigliceridemie sînt consumatori cronici de alcool. Oprirea consumului de alcool și de grăsimi și alimentarea parenterală duc la o scădere spectaculoasă a trigliceridelor și la normalizarea spectrului lipoproteinelor serice (vezi fig. 1.14). În cazul în care hipertrigliceridemia nu revine la normal se poate bănui că o hiperlipoproteinemie cu caracter primar a preexistat episodului de pancreatită declanșat de consumul de alcool.

De notat că instalarea unei ciroze atrofice la un alcoolic se însoțește de o scădere a lipidelor serice sub valorile medii normale.

Există și date conform cărora un consum moderat de alcool ar duce la creșteri ale HDL cu rol de limitare a aterogenezei. Noțiunea de „consum moderat" este însă insuficient precizată iar rolul unui astfel de consum în prevenirea aterosclerozei nu a fost încă dovedit.

I.4.1.4. HIPERLIPEMIA DIN HIPOTIROIDISM

Hiperlipemia mixedematoșilor se manifestă de regulă prin creșterea colesterolului și, în special, a LDL-colesterolului și pare a se datora unei reduceri a numărului de receptori pentru LDL și IDL și implicit unei încetiniri în procesul de captare și catabolizare a acestor lipoproteine. Totodată este perturbată transformarea colesterolului în acizi biliari.

Mobilizarea de AGL din țesutul adipos și sinteza de trigliceride în ficat sînt diminuate dar, din cauza unui deficit exprimat al mecanismului de hidroliză a trigliceridelor plasmatice (activitatea lipoproteinlipazei dar mai ales a lipazei hepatice mult reduse), nivelul trigliceridelor poate crește.

Caracteristica principală a hiperlipemiei din hipotiroidism este astfel reprezentată de o încetinire a proceselor de turn-over ale lipoproteinelor. Terapia cu hormoni tiroidieni normalizează spectrul lipoproteinelor plasmatice, fapt care constituie de altfel un test de eficacitate a medicației aplicate (vezi fig. 1.14).

I.4.1.5. HIPERLIPEMIA DIN COLESTAZĂ

Creșteri ale colesterolului (liber mai ales) și ale fosfolipidelor pot fi întîlnite și în caz de obstrucție a căilor biliare. Retenția acestor lipide care, în mod normal, se elimină prin bilă, împreună cu acizii biliari și bilirubina, duce la formarea unor complexe lipoproteice particulare, bogate în colesterol liber și fosfolipide. Un astfel de complex este așa-zisa lipoproteină X (Lp X) care, la electroforeza în gel de agaroză, migrează înapoia beta lipoproteinelor de care se diferențiază însă cu greu. În schimb, la electroforeza în gel de agar, Lp X este singura lipoproteină care migrează spre polul negativ și poate fi evidențiată prin precipitarea în gel sub acțiunea unor polianioni și a unor cationi bivalenți (de exemplu, dextransulfat și $CaCl_2$). Dozări cantitative ale Lp X sugerează că nivelul acestei lipoproteine anormale este mai crescut în colestaza extrahepatică față de cea intrahepatică. În ultima stare patologică amintită (de exemplu, în colestaza din ciroza biliară) se constată în schimb apariția unei lipoproteine cu migrare alfa încetinită (vezi fig. 1.14). Valoarea diagnostică a lipidelor și lipoproteinelor în procesele colestatice este însă redusă în comparație cu modificările extrem de exprimate constînd din creșteri ale acizilor biliari, ale fosfatazei alcaline și gammaglutamiltransferazei.

I.4.1.6. HIPERLIPOPROTEINEMII ÎN MIELOMATOZĂ

Hiperlipoproteinemia însoțită uneori de xantome cutanate survine doar rareori în cursul mielomului multiplu și, în mod ocazional, în cursul altor boli evoluînd cu hipergammaglobulinemie (de exemplu, lupoeritematoviscerita). Deși rară, hiperlipoproteinemia indusă de imunoglobuline prezintă un deosebit interes teoretic denotînd posibilitatea intervenției proceselor imune în mecanismele care reglează metabolismul lipoproteinelor.

În unele cazuri, imunoglobulinele pot afecta funcția lipoproteinlipazei formînd complexe fie cu enzima, fie cu lipoproteinele, respectiv cu apo C-II.

În alte cazuri, imunoglobulinele pot bloca apoproteinele care constituie „unități de recunoaștere" prin care receptorii celulari captează lipoproteinele. Considerăm că merită amintite în acest sens observațiile privind două cazuri de mielom multiplu (unul cu IgA iar altul cu IgG) care au prezentat xantomatoză și hiperlipoproteinemie caracterizată, în primul rînd, prin creșterea resturilor VLDL (IDL) și realizînd aspectul fenotipului III (vezi pag. 57). Studii de cinetică efectuate *in vivo* (vezi pag. 44) au evidențiat o încetinire marcată a vitezei de catabolizare a IDL și a procesului de conversie a IDL spre LDL. Pe de altă parte, cercetări efectuate *in vitro* au demonstrat că particulele de LDL, prelevate de la cei doi bolnavi, nu erau captate de către limfocitele normale. Pe baza acestor date ca și prin demonstrarea prezenței imunoglobulinelor în preparatele de VLDL, IDL și LDL, separate din plasma bolnavilor, se consideră că, prin formarea de complexe între globulinele mielomatoase și apoproteina B_{100}, se perturbă procesul de recunoaștere și captare, la nivelul receptorilor celulari, a lipoproteinelor conținînd această apoproteină (12).

I.4.1.7. HIPOLIPEMII SECUNDARE

Aceste modificări au o importanţă diagnostică redusă. Este important de precizat că nou-născuţii prezintă o hipolipemie fiziologică, dar că valorile colesterolemiei de aproximativ 70 mg/dl (1,8 mmol/l) şi respectiv al trigliceridelor serice de aproximativ 20 mg/dl (0,23 mmol/l), găsite la naştere, cresc brusc în cursul primei săptămîni de viaţă iar, la aproximativ patru luni, se stabilesc în jurul mediei pentru grupa de vîrstă de pînă la 9 ani (vezi tabelul I.3).

Colesterolemia şi beta-lipoproteinele sînt, de regulă, sub media normalului la bolnavii cu *hipertiroidism sever*. De notat că sinteza hepatică de colesterol şi de trigliceride este, de cele mai multe ori, accelerată. În acelaşi timp însă, viteza de degradare a LDL şi de transformare a colesterolului în acizi biliari decurge şi mai accelerat la pacienţii cu hipertiroidism. S-a putut de altfel demonstra că hormonii tiroidieni stimulează puternic formarea receptorilor celulari pentru LDL (vezi pag. 38). Se poate afirma deci că hipertiroidismul se caracterizează printr-o intensificare a proceselor de reîmprospătare (turn-over) a lipoproteinelor. Spectrul electroforetic al lipoproteinelor serice se caracterizează prin scăderea procentului de beta-lipoproteine şi creşterea fracţiunilor prebeta şi alfa. Concomitent cu aceste modificări şi, probabil, în strînsă legătură cu amintita accelerare a vitezei de turn-over a lipoproteinelor, se constată o creştere a pseudocolinesterazei (enzimă care reflectă funcţia proteosintetică a ficatului) (vezi pag. 45 şi pag. 220). Scăderea marcată a raportului colesterol/pseudocolinesterază este de altfel o caracteristică a hipertiroidismului.

Scăderea sintezei de lipoproteine se întîlneşte în *denutriţia cronică*, în *anemii* şi, bineînţeles, în *insuficienţa hepatică*. De precizat că, deşi ficatul are un rol esenţial în sinteza lipidelor şi lipoproteinelor serice, scăderea evidentă a acestora (mai ales a fracţiunilor alfa şi prebeta) se constată doar în cirozele hepatice şi insuficienţa hepatică persistentă (evoluînd cu ascită şi sindrom hemoragic). Caracteristică pentru insuficienţă hepatică este scăderea esterilor de colesterol datorită cel puţin în parte deficitului de LCAT (vezi pag. 34), enzimă secretată de ficat şi responsabilă de esterificarea colesterolului în plasmă.

Reamintim că afecţiunile hepatice însoţite de colestază, în special icterul mecanic, evoluează cu hipercolesterolemie (vezi pag. 50). Problema comportării metaboilismului lipidic în afecţiunile hepatice prezintă interes şi prin faptul că perturbarea sintezei hepatice a unor apoproteine poate afecta procesele de clearence şi de captare intracelulară a lipoproteinelor. Complexitatea acestei probleme reiese, cu deosebită pregnanţă, în cursul *tratamentului cu L-asparaginază al leucemiilor*. În această situaţie, carenţa de L-asparagină perturbă sinteza de proteine, deci şi de lipoproteine, la nivelul ficatului. Se ajunge la o scădere marcată a colesterolului (adeseori sub 100 mg/dl) şi a fracţiunii alfa, în timp ce fracţiunile beta şi prebeta îşi pierd structura şi se întind ca o trenă spre locul de aplicare a serului. Acest aspect pare a fi datorat scăderii raportului între lipide şi apoproteine. Deficitul de apoproteine, cu rol de cofactor în activitatea enzimelor, lipolitice (de exemplu, apo C-II) ar putea explica şi creşterile trecătoare de trigliceride observate, uneori, în cursul terapiei cu L-asparaginază, ca şi în unele cazuri de hepatită acută.

Se poate deci afirma că modificările lipoproteinelor serice în afecţiuni hepatice apar ca o rezultantă a deficitului de sinteză şi de secreţie, pe de o parte, şi a perturbării proceselor de clearence, pe de altă parte.

Sindromul de malabsorbţie se poate însoţi, în unele cazuri, de o scădere importantă a lipoproteinelor. Ilustrativă în acest sens este situaţia bolnavului Z. A. de 68 de ani, cu limfom localizat în plăcile lui Peyer din intestinul subţire, care prezenta sindrom de malabsorbţie şi hipolipemie extrem de accentuată (vezi fig. 1.14).

Un mecanism patogenetic particular este reprezentat de *leucemiile mieloblastice* în care scăderea LDL-colesterolului pare a se datora mai ales unei captări accelerate a LDL la nivelul receptorilor de la suprafaţa mieloblaştilor, probabil în legătură cu utilizarea accelerată a colesterolului pentru formarea membranelor acestor celule în plină proliferare.

I.4.2. DEREGLĂRI CU CARACTER PRIMAR ÎN METABOLISMUL LIPOPROTEINELOR

Atunci cînd poate fi exclus caracterul secundar și cînd rudele subiectului prezintă și ele anomalii ale lipidelor serice, se poate afirma existența unei dereglări cu caracter primar. Deși astfel de anomalii sînt cauzate de mutații afectînd receptorii celulari, apoproteinele sau enzimele implicate în metabolismul lipoproteic, factorii genetici nu pot explica în totalitate aspectele clinice și de laborator depistate, iar, în multe cazuri, factorii de mediu(alimentație, modul de viață) contribuie în marea măsură la dezvoltarea acestor aspecte.

Așa, de exemplu, pe fondul unei anomalii genetice a apoproteinei E, alimentația hipercalorică și alcoolul pot determina apariția unei creșteri importante a IDL (ß-VLDL) și, respectiv, dezvoltarea fenotipului III care altfel nu ar fi avut expresie (vezi pag. 57).

O clasificare a anomaliilor afectînd lipoproteinele ar trebui să se bazeze pe cunoașterea mecanismului patogenetic principal care stă la baza respectivei anomalii. Grație progreselor realizate în cunoașterea biochimiei apoproteinelor, a mecanismelor enzimatice implicate în catabolizarea lipoproteinelor și a interacțiunii lipoproteinelor cu receptorii celulari s-au creat premisele unei astfel de clasificări patogenetice. Înainte de a încerca o clasificare de acest tip, considerăm util să prezentăm clasificarea propusă de Fredrickson, Levy și Lees, cu modificările aduse de o comisie de experți OMS (2) (vezi tabelul 1.4) și care este încetățenită în laboratoarele clinice, fiind bazată pe evaluarea creșterii unei anumite fracțiuni a lipoproteinelor serice (17). Atragem însă de pe acum atenția că un anumit tip de hiperlipoproteinemie, prezentînd aspecte caracteristice ale lipidelor și lipoproteinelor serice, poate fi cauzat prin mecanisme diferite tot așa cum una și aceeași boală de bază poate da aspecte lipoproteice diferite.

I.4.2.1. HIPERLIPOPROTEINEMII GENETICE

I.4.2.1.1. *CREȘTEREA CHILOMICRONILOR* (tipul I)

Nivelul extrem de ridicat al trigliceridelor (de regulă peste 1000 mg/dl, respectiv peste 11 mmol/l) se însoțește de atacuri recurente de pancreatită, xantoame eruptive (mici noduli galbeni pruriginoși pe tegumente), hepatosplenomegalie, impregnare cu lipide a retinei (lipemia retinalis). Aceste manifestări, apărute la un copil sau adult tînăr neobez și nediabetic, la care plasma răcită la 4°C are tendință să se smîntînească, atrage atenția asupra hiperchilomicronemiei, care este apoi confirmată de electroforeza în agaroză a lipoproteinelor (45).

Mecanismul de producere a hiperchilomicronemiei este reprezentat de o perturbare a proceselor care asigură îndepărtarea trigliceridelor din plasmă după absorbția lor intestinală. O asemenea perturbare poate fi consecința unui deficit familial de lipoproteinlipază sau de apoproteină C-II (cofactorul lipoproteinlipazei). S-a dovedit și posibilitatea inhibării, pe cale imunologică, a lipoproteinlipazei în cazuri de hiperimunoglobulinemie (vezi pag. 50).

Hiperchilomicronemia şi fenomenele asociate se ameliorează în urma restrîngerii lipidelor din alimentaţie la 10—20 g/zi. De notat că manifestările clinice de ateroscleroză survin rareori la subiecţii cu hiperchilomicronemie, care pot însă prezenta atacuri repetate de pancreatită acută.

I.4.2.1.2. *CREŞTEREA BETA-LIPOPROTEINELOR* (tipul II-a)

Majoritatea subiecţilor prezentînd acest fenotip, caracterizat prin creşterea izolată a colesterolului din LDL şi nivel normal al trigliceridelor şi respectiv al VLDL, se încadrează în *hipercolesterolemia familială*, o entitate nosologică bine definită astăzi sub aspect patogenetic. Aşa cum se va vedea însă ulterior, unele cazuri de hiperlipoproteinemie familială combinată (vezi pag. 60), avînd alte mecanisme de producere, pot realiza şi ele fenotipul II-a.

Perturbările clinice şi metabolice ale hipercolesterolemiei familiale sînt analizate în mod succint. Această anomalie, cu mecanism de transmitere autosomal dominant, este destul de frecvent întîlnită în populaţie. Se consideră că incidenţa heterozigoţilor este de la 1 la 500 în timp ce homozigoţii se întîlnesc extrem de rar (1 la 1.000.000). Aceştia din urmă dezvoltă însă o hipercolesterolemie excesivă (peste 600 mg/dl respectiv 15,54 mmol/l) realizată mai ales pe seama colesterolului LDL şi asociată cu leziuni aterosclerotice severe ale coronarelor care se manifestă clinic înaintea vîrstei de 20 de ani. Totodată se produc infiltraţii de colesterol în piele şi tendoane, ce constituie xantoamele planare sau tuberoase pe genunchi, fese şi coate, precum şi xantoamele tendinoase localizate mai ales pe tendonul lui Ahile.

În cazul heterozigoţilor, colesterolemia este de 300—500 mg/dl iar colesterolul din LDL depăşeşte 250 mg/dl (6,47 mmol/l). Manifestările de tipul xantoamelor tuberotendinoase apar mai rar şi în măsură mult mai redusă la heterozigoţi iar manifestările clinice de ateroscleroză coronariană, deşi frecvente, apar, de regulă, după vîrsta de 40 de ani.

Aşa cum se vede şi din tabelul 1.4 şi fig. 1.15, fenotipul II-a se caracterizează prin creşterea izolată a colesterolului şi a LDL, în timp ce trigliceridele şi VLDL se situează în limite normale.

Mecanismul de producere a hipercolesterolemiei familiale este reprezentat de un deficit sever al receptorilor pentru LDL. S-au descoperit pînă în prezent cel puţin 10 diferite mutaţii care pot duce la un deficit de receptori şi care pot surveni în diverse etape ale complexului proces de elaborare a receptorilor de către celulă. Din punctul de vedere al etapei afectate, mutaţiile pot fi împărţite în patru clase diferite (21).

În *clasa I*, cea mai frecvent întîlnită, gena mutantă nu este în măsură să determine sinteza de receptori la nivelul reticulului endoplasmic rugos, astfel încît receptorii sînt nedecelabili. Mutaţiile din *clasa a II-a* nu afectează sinteza de receptori, sau mai bine zis de precursori ai acestora, dar ei nu sînt ulterior transportaţi în aparatul Golgi şi nu ajung să fie completaţi prin adaosul de galactoză şi acid sialic. *Clasa a III-a* codifică producerea unor receptori care, deşi sînt prelucraţi în aparatul Golgi şi transportaţi pînă la suprafaţa celulei, nu sînt în măsură să lege adecvat particulele de LDL. Natura modificărilor care duc la apariţia acestor re-

Tabel 1.4.

Comportarea lipidelor serice în diversele tipuri de hiperlipoproteinemie. Valorile medii ±, eroarea standard a mediei în tipurile II a, II b, IV şi V sînt redate pe baza observaţiilor proprii. Pentru tipurile I şi III s-au preluat datele relatate de Schaefer şi Levy (45). Din aceeaşi sursă s-au luat valorile pentru LDL colesterol şi rapoartele LDL colesterol/HDL colesterol şi VLDL colesterol/VLDL trigliceride*.

Tip	Modificări ale fracţiunilor lipoproteice	Aspectul plasmei răcite	Lipide serice		Raport colesterol/ trigliceride în plasmă	LDL — colesterol	Raport LDL-colesterol/HDL-colesterol	Raport VLDL-colesterol/ VLDL-triglic.
			Colesterol	Trigliceride				
I 12 cazuri	Hiperchilomicronemie	smîntînos infranatant clar	324 ± 57 poate fi şi normal	3316±677	0,10	22	1,29	0,09
II a 53 cazuri	Hiperbetalipropoteinemie (Hiper LDL)	clar	358 ± 9,1	130±3,4	2,71	280	6,5	0,18
II b 130 cazuri	Hiperbeta + creşterea prebeta (LDL+VLDL)	clar sau opalescent	334 ± 5,8	211±5,04	1,54	230	6,0	0,18
III 66 cazuri	Hiper —VLDL (beta lată)	mai des opalescent	441 ± 54	694±60	0,60	111	2,97	0,42
IV 86 cazuri	Hiperprebeta (hiper VLDL)	opalescent pînă la lactescent	280 ± 10	510±34	0,55	140	3,78	0,18
V 20 cazuri	Creşterea prebeta şi a chilomicronilor	lăptos, infranatant opalescent	370 ± 40	2100±230	0,18	70	2,67	0,13

* Valorile normale ale rapoartelor colesterol/trigliceride în plasmă, LDL-colest./HDL colesterol şi VLDL colesterol/VLDL triglic. sînt de 2,17 ; 2,47 şi respectiv 0,18.

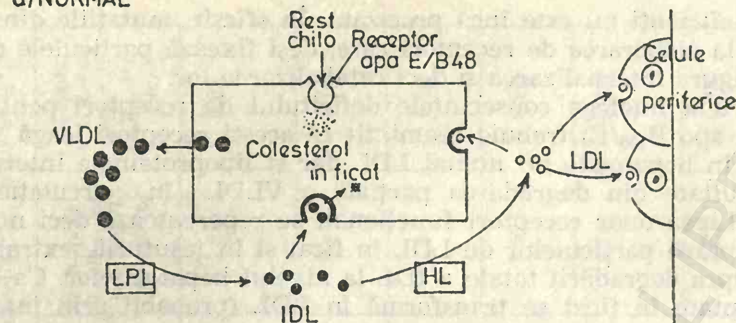
ceptori ineficienți nu este încă precizată. În sfîrșit, mutațiile din *clasa a IV-a* duc la elaborarea de receptori care, deși fixează particulele de LDL, nu pot asigura internalizarea și deci catabolizarea lor.

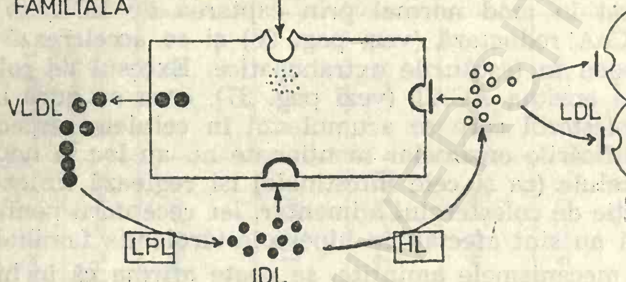
Pentru a înțelege consecințele deficitului de receptori pentru LDL (receptori apo B_{100}/E) trebuie reamintit că acești receptori leagă și internalizează în hepatocite nu numai LDL dar și lipoproteinele intermediare (IDL) rezultate din degradarea parțială a VLDL în circulație (vezi pag. 35). Lipsa unor receptori funcționali se repercutează deci nu numai asupra captării particulelor de LDL în ficat și în țesuturile extrahepatice dar și asupra degradării totale a IDL la nivelul hepatocitelor. Ca urmare, IDL necaptate în ficat se transformă în LDL (probabil prin intervenția lipazei hepatice), astfel încît nivelul de LDL crește, nu numai ca urmare a lipsei de captare, dar și prin accentuarea procesului de transformare a IDL în LDL (vezi fig. 1.16). Totodată, datorită scăderii aportului de colesterol, furnizat în mod normal prin captarea de LDL, se dereprimă enzima HMG-CoA reductază (vezi pag. 26) și se accelerează sinteza de colesterol endogen în țesuturile extrahepatice. Excesul de colesterol din celule activează enzima ACAT (vezi pag. 37), ceea ce duce la formarea de esteri de colesterol care se acumulează în celulele respective. Menționăm că modificările enzimelor menționate nu au loc în hepatocite deoarece aceste celule (ca și cele intestinale) își reglează sinteza de colesterol și în funcție de colesterolul alimentar, iar receptorii pentru resturile de chilomicroni nu sînt afectați în hipercolesterolemia familială (21).

Rezumînd mecanismele amintite, se poate afirma că în hipercolesterolemia familială sinteza hepatică de colesterol și de VLDL decurge normal, după cum normală este și catabolizarea parțială a particulelor de VLDL pînă la stadiul de IDL. Din cauza deficitului de receptori, acestea din urmă nu sînt captate în suficientă măsură în ficat și se transformă în LDL care se acumulează în exces, nefiind nici ele captate de receptorii apo B/E din ficat și țesuturile extrahepatice. De fapt, cercetări efectuate cu LDL marcate cu izotopi radioactivi și injectate în circulație au demonstrat că particulele amintite persistă în sîngele subiectului cu hipercolesterolemie familială un timp de două ori și jumătate mai lung decît la subiecții sănătoși. În cele din urmă, particulele LDL sînt îndepărtate din plasmă chiar și la bolnavii cu anomalia mai sus menționată, datorită unor mecanisme independente de receptorii specifici și evident mai puțin eficiente. Un astfel de mecanism este captarea în macrofage a particulelor LDL, mai ales după ce ele au suferit anumite modificări structurale (vezi și pag. 38).

La heterozigoți, care constituie majoritatea pacienților cu acest tip de hiperlipoproteinemie, numărul receptorilor pentru LDL este de aproximativ jumătate din cel întîlnit la normali, iar modificările amintite survin într-un grad atenuat. Numărul redus de receptori nu poate preveni creșterea la valori duble sau chiar triple față de normal a concentrației LDL în mediul extracelular, dar este totuși în măsură să furnizeze colesterol celulelor, producînd astfel o reprimare a sintezei de HMG-CoA reductază și respectiv o moderare a activității acestei enzime.

Există indicii asupra existenței unor defecte minore în procesul de catabolizare a LDL. Astfel de subiecți ajung să prezinte hipercolesterolemie doar în condiții particulare, de exemplu atunci cînd devin supra-





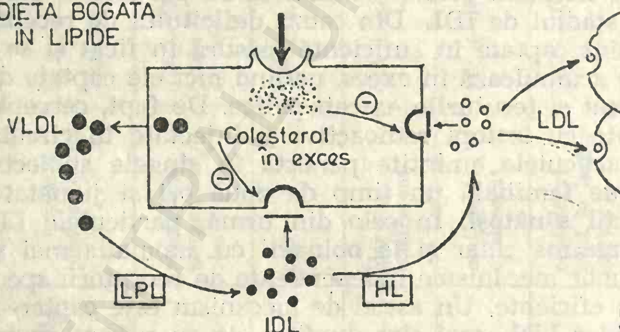


Fig. 1.16. Rolul deficitului genetic sau cîştigat de receptori la LDL în determinarea hipercolesterolemiei. Adaptarea după Goldstein şi Brown (21). a) *La normali* VLDL secretate de ficat sînt convertite în IDL sub acţiunea lipoproteinlipazei (LPL) la nivelul endoteliilor capilare din ţesutul muscular şi adipos, iar o bună parte a particulelor IDL este captată de receptorii pentru LDL (receptorii apo B100/E) şi receptorii la apo E, ambii din ficat. Restul particulelor IDL se transformă în LDL sub acţiunea lipazei hepatice (HL) fiind, ulterior, şi ele captate de către receptorii hepatici sau de alte ţesuturi. Se poate vedea că aportul de colesterol spre hepatocite depinde nu numai de captarea IDL şi LDL de către receptorii specifici menţionaţi dar şi de colesterolul venit pe calea resturilor de chilomicroni şi captate prin receptori la apo E. O altă sursă este colesterolul provenit din captarea HDL (nearătat în figură). b) *în hipercolesterolemia familială* diminuarea condiţionată genetic a receptorilor hepatici faţă de LDL (şi parţial IDL) face ca particulele necaptate de IDL să treacă în LDL care, nefiind nici ele captate, cresc mult în plasmă. c) *dieta bogată în lipide saturate şi colesterol* poate şi ea duce la un deficit de receptori hepatici la LDL şi IDL; de fapt, încărcarea ficatului cu colesterol din surse alimentare reprimă sinteza de receptori în ficat dar nu şi în alte ţesuturi.

ponderali sau atunci cînd consumă cantități crescute de grăsimi saturate și de colesterol. La persoanele amintite, nivelul colesterolemiei poate fi mai ușor redus prin măsuri igieno-dietetice decît în cazurile de hipercolesterolemie familială. Comportarea față de colesterolul alimentar permite împărțirea acestor subiecți în non- și hiperreactivi (non-, hyperresponders), primii avînd colesterolemia nemodificată la un adaos moderat de colesterol alimentar, în timp ce a doua categorie prezintă creșteri semnificative. Astfel de diferențe s-ar putea explica prin capacitatea diferită de represie a sintezei de colesterol și a numărului de receptori pentru LDL (vezi pag. 36). Hipercolesterolemiile apărute în aceste condiții sînt deci în mare măsură rezultatul unei diete neraționale (21).

I.4.2.1.3. *CREȘTEREA BETA-VLDL (tipul III, disbetalipoproteinemia)*

Această anomalie se caracterizează prin creșterea concomitentă a trigliceridelor și colesterolului datorită nivelului anormal de ridicat al unor lipoproteine cu densitate foarte joasă care se deosebesc însă de VLDL normale printr-un conținut neobișnuit de mare în colesterol iar la electroforeza în gel de agaroză migrează cu fracțiunea beta și nu cu prebeta lipoproteinele (β-VLDL). Aspectul foreogramei este de beta lată (vezi fig. 1.15) iar în fracțiunea beta, izolată prin ultracentrifugare, raportul dintre colesterol și trigliceride este totdeauna mai mare de 0,30 (acest raport fiind sub 0,25 în VLDL de la subiecții normali).

Pacienții cu hiperlipoproteinemie tip III prezintă un risc crescut pentru apariția precoce a manifestărilor clinice ale aterosclerozei. Adeseori ei sînt supraponderali, hiperuricemici și au o toleranță scăzută la testul de încărcare cu glucoză. Se constată de asemenea o mare tendință la dezvoltarea xantoamelor tuberoeruptive și palmare. Toate manifestările descrise apar, de regulă, la vîrsta adultă (45).

Mecanismele prin care se dezvoltă acest tip de hiperlipoproteinemie au fost elucidate abia în ultimi ani. S-a demonstrat astfel că majoritatea subiecților cu hiperlipoproteinemie tip III sînt homozigoți pentru apolipoproteina E_2 (E_2/E_2), în timp ce forma normală a acestei apoproteine este alela E_3. Anomalia în cauză, dată de înlocuirea argininei din poziția 158 prin cistină (158 Arg→Cis), face ca resturile de chilomicroni și de VLDL (respectiv IDL) să nu mai fie recunoscute de receptorii specifici și să crească mult în sînge. La același rezultat se ajunge în cazurile mult mai rare de deficit de apo E sau deficit de lipază hepatică, despre care se știe că are un rol în transformarea IDL în LDL. Observarea acestor bolnavi a evidențiat faptul că dezvoltarea manifestărilor clinice și de laborator sînt în mare măsură favorizate de factori de mediu ca de exemplu alimentația hipercalorică care duce la supragreutate și la sinteză crescută de VLDL iar, pe de altă parte, că un regim igienodietetic adecvat, care duce la slăbire, se însoțește de o ameliorare dramatică a hiperlipemiei. Se poate deci presupune că o sinteză accelerată de VLDL urmată de o prelucrare relativ normală a acestora în circulație (vezi pag. 35) duce la o creștere a IDL și a resturilor de chilomicroni al căror catabolism este însă blocat, particulele mai sus amintite, prevăzute cu un apo E normal, neputînd fi captate de receptori, deși aceștia sînt în număr normal.

I.4.2.1.4. *CREȘTEREA PREBETALIPOPROTEINELOR (tipurile IIb, IV, V)*

Această anomalie, evoluînd cu creșterea trigliceridelor, este extrem de frecventă dar totodată deosebit de heterogenă atît în privința aspectelor realizate de spectrul lipidelor serice cît și în ce privește mecanismele patogenetice și riscul de apariție a aterosclerozei.

De regulă, creșterea VLDL survine la adulți și se însoțește, în majoritatea cazurilor, de hiperuricemie, supragreutate și scăderea toleranței la glucoză, manifestările xantomatoase survenind însă rareori.

Creșterea izolată a prebeta lipoproteinelor (hiper VLDL) este caracteristică tipului IV, creșterea VLDL și a LDL (de regulă LDL > VLDL) realizează tipul II-b, iar creșterea concomitentă a VLDL și a chilomicronilor survine în tipul V. O bună parte a subiecților cu tipurile II-b și IV precum și unele cazuri mai rare cu tipul V se pot încadra în așa-zisa *hiperlipemie combinată familială,* anomalie frecvent asociată cu ateroscleroza coronarelor. Caracteristică pentru această formă de hiperlipoproteinemie este creșterea apoproteinei B în VLDL și LDL care nu se însoțește, de regulă, de creșterea proporțională a colesterolemiei. Se ajunge astfel la o creștere a raportului apo B/colesterol. Mecanismul principal de producere este reprezentat de o creștere a secreției de VLDL. De fapt, studiile de cinetică au demonstrat o producție crescută și un proces de remaniere accelerat al acestor particule care interesează nu numai trigliceridele și colesterolul dar și apoproteina B (45). Se realizează astfel o creștere a numărului de particule și nu doar o supraîncărcare a lor cu trigliceride. Este de la sine înțeles că gradul *hipertrigliceridemiei endogene* depinde nu numai de viteza de secreție a VLDL ci și de eficiența mecanismelor care asigură îndepărtarea din plasmă a unor astfel de particule, eficiență care variază de la individ la individ. Așa, de exemplu, femeile tinere au o capacitate de clearence mai mare decît bărbații pentru trigliceride, fapt care explică nivelul plasmatic mai scăzut al acestor lipide în perioada fertilă a sexului feminin.

În marea majoritate a cazurilor cu hipertrigliceridemie tip II-b și IV sistemele de îndepărtare din plasmă a VLDL funcționează normal, fiind însă depășite de producția excesivă. Într-o proporție redusă a cazurilor există un defect de clearence al trigliceridelor și bineînțeles că, în asemenea situații, hipertrigliceridemia este mult mai accentuată, ajungîndu-se uneori la aspectele realizate de fenotipul V.

Există însă și posibilitatea unei sporiri marcate a capacității de îndepărtare a trigliceridelor din plasmă, astfel încît creșterea sintezei de VLDL este în bună măsură compensată iar nivelul trigliceridelor puțin modificat. În astfel de situații, singura modificare decelabilă este accelerarea proceselor de turn-over a VLDL.

Soarta particulelor de IDL și LDL, rezultate din catabolismul VLDL, depinde de numărul și eficiența receptorilor apo B-100/E. Astfel, în unele cazuri de obezitate, evoluînd cu lipemie în limite practic normale, producția crescută de VLDL este pe deplin compensată de o catabolizare rapidă a acestora precum și a particulelor de LDL rezultate (16). Pe de altă parte, în condițiile unei eficiențe reduse a receptorilor, asociată cu o sinteză accelerată de VLDL și o capacitate normală de prelucrare a VLDL în plasmă, se poate ajunge la o creștere exprimată a LDL și la

Tabelul 1.5

Particularităţi clinice şi metabolice asociate adeseori cu diversele tipuri de hiperlipoproteinemie cu caracter familial. Aceste particularităţi nu se aplică neapărat în hiperlipemiile cu caracter secundar (trecute în ultima coloană), chiar dacă ele pot realiza aspectul fenotipurilor descrise de Fredrickson şi Lees.

Tip	Frecvenţa	Manifestări clinice asociate	Toleranţa la glucoză	Asociere cu obezitatea	Nivel plasmatic al enzimelor de secreţie hepatică (colinesterază, LCAT, F XIII)	Manifestări de ateroscleroză	Forme secundare unor îmbolnăviri comune ca:
I	f. rară	Xantoame eruptive. Hepatomegalie. Atacuri de pancreatită acută· Dureri abdominale	normală	rar	?	rare	Diabet grav Alcoolism Mielomatoză (excepţional de rar)
II a	frecventă (heterozigoţi)	Xantelasmă palpebrală. Xantomatoză tuberotendinoasă	normală	rar	mai des normale	frecvente şi precoce	Hipotiroidism, uneori în sindrom nefrotic
II b	frecventă	De regulă nu dezvoltă xantomatoză	normală sau scăzută	destul de des	de regulă crescute	frecvente	Hipotiroidism Sindrom nefrotic
III	relativ rară	Xantomatoză tuberotendinoasă (adeseori palmară)	adeseori scăzută	deseori	?	frecvente şi precoce	Mielomatoză (excepţional de rar)
IV	frecventă	Hepatomegalie moderată	adeseori scăzută	deseori	de regulă crescute	frecvente	Diabet. Sindrom nefrotic, alcoolism
V	relativ rară	Aceleaşi ca în tipul I dar mai atenuate	adeseori scăzută	deseori	Comportare variabilă de la caz la caz	relativ mai mare	Diabet grav Alcoolism Sindrom nefrotic

realizarea fenotipului II-a. De fapt, studii de cinetică au demonstrat că o serie de subiecţi cu fenotipul II-a se încadrau mai degrabă în hiperlipemia combinată familială şi nu în hipercolesterolemia familială (45).

Există astăzi tendinţa de a diferenţia în cadrul fenotipului IV o entitate denumită *hipertrigliceridemia familială* şi care diferă de hiperlipemia combinată printr-un nivel mai scăzut al apoproteinei B-100 şi o valoare normală a raportului apo B-100/colesterol, precum şi printr-un risc relativ redus de ateroscleroză (45). Se pare că, spre deosebire de hiperlipoproteinemia combinată familială, hipertrigliceridemia familială se caracterizează nu atît printr-un număr crescut de particule VLDL, cît mai ales printr-o creştere a încărcăturii de trigliceride pe fiecare particulă. Aşa cum s-a arătat dezvoltarea fenotipului V implică existenţa unor deficienţe în desfăşurarea proceselor de îndepărtare a trigliceridelor din plasmă. Spre deosebire de hiperchilomicronemia din tipul I, creşterea VLDL şi chilomicronilor din tipul V prezintă rareori deficite severe de lipoproteinlipază sau de apoproteină CII dar subiecţii sînt adeseori homo- sau heterozigoţi pentru o formă rară de apoproteină E(apo E_4), care are o afinitate relativ normală pentru receptori, şi prezintă o creştere a apoproteinei CIII bogată în acid sialic (apo $CIII_2$) care limitează acţiunea lipoproteinlipazei şi întîrzie captarea chilomicronilor din plasmă. Există şi cazuri de hiperlipemie tip V în care, la defectele genetice menţionate, se asociază o secreţie accelerată de VLDL caracteristică hiperlipemiei familiale combinate iar alcoolul, terapia cu estrogeni, diabetul şi obezitatea accentuează mult hipertrigliceridemia.

Reproducem schematic în fig. 1.13 mecanismele prin care se poate instala creşterea trigliceridelor şi respectiv a VLDL.

I.4.2.2. ANALIZA CRITICĂ A DATELOR PRIVIND HIPERLIPOPROTEINEMIILE

Cele arătate mai sus sînt în măsură să atragă atenţia asupra faptului că vechea clasificare propusă de OMS (vezi tabelul 1.4) nu dă indicii asupra defectului molecular care stă la baza anomaliei. Aşa, de exemplu, fenotipul II a poate surveni atit în hipercolesterolemia familială, care are la bază un deficit de receptori, cit şi în hiperlipemia combinată familială, cînd aspectul se realizează printr-o secreţie accelerată de VLDL rapid catabolizate spre LDL. De asemenea, hipertrigliceridemiile endogene, cu aspect de tip IV, pot fi rezultatul unor dereglări diferite în care excesul de sinteză sau deficitul de clearence intervin în proporţii variabile. Se pare că deficitul de îndepărtare din plasmă a trigliceridelor reprezintă fondul genetic, iar accelerarea sintezei hepatice ar fi consecutivă supragreutăţii şi modului de viaţă (sedentarism, alimentaţie hipercalorică şi bogată în dulciuri).

Diferenţierea hiperlipoproteinemiilor în funcţie de defectul molecular ar implica determinări de apolipoproteine şi de variante ale acestora, explorarea activităţii enzimelor implicate în metabolismul lipidic şi evaluarea eficienţei receptorilor celulari. Chiar şi simpla diferenţiere a unei hiperlipemii produse prin defect de catabolizare de una cauzată de o sinteză crescută ar implica studii de cinetică cu lipoproteine marcate cu izotopi. După părerea noastră, observarea creşterii în plasmă a enzimelor de secreţie hepatică (pseudocolinesteraza, LCAT) ar putea sugera o creştere a sintezei de VLDL. Evident însă că o astfel de ipoteză ar trebui verificată prin studierea concomitentă a cineticii lipoproteinelor şi a secreţiei enzimelor hepatice. În tabelul 1.6 se încearcă

Tabelul 1.6

Mecanisme patogenice, defectele moleculare depistate pînă în prezent, entitățile genetice realizate și corespondența acestora cu fenotipurile descrise de Fredrickson și Lees.

Mecanismul patogenetic	Defectul molecular	Modificări consecutive (creșteri de)	Entitatea genetică	Fenotipul realizat
Defect sever de îndepărtare a trigliceridelor din plasmă	Deficit de lipoproteinlipază Deficit de apo C-II	chilomicroni	Hipertrigliceridemie exogenă severă (autosomal recesivă)	I
	Apo-C III anormală (C III_2) Variantă de apo $E(E_4/E_4)$	chilomicroni, VLDL		V
Defect de îndepărtare a IDL și a resturilor de chilomicroni la nivelul ficatului	Deficit de apo E Variantă de Apo $E(E_2/E_2)$ Deficit de lipază hepatică	βVLDL (IDL)	Disbetalipoteinemia (autosomal recesivă)	III
Defect de îndepărtare a LDL și a IDL care se transformă în LDL	Deficit de receptori Apo B—100/Apo E în ficat și țesuturile extrahepatice	LDL	Hipercolesterolemie familială (autosomal dominantă)	II a
Accelerarea sintezei de VLDL interesînd mai ales trigliceridele și în mai mică măsură apo B—100; Defect minor de clearance	?	VLDL	Hipertrigliceridemie familială (autosomal dominantă)	IV
Accelerarea sintezei de VLDL, inclusiv a apo B—100. Turn-over accelerat	?	VLDL VLDL+LDL mai rar: LDL VLDL+chilomicr.	Hiperlipemie combinată familială (autosomal dominantă)	mai des IV și II b mai rar II a V

o prezentare a mecanismelor patogenetice prin care se ajunge la dezvoltarea hiperlipoproteinemiilor și a defectelor moleculare care stau la baza acestor anomalii. De notat că la ora actuală nu s-au găsit încă defectele moleculare care determină o exagerare a sintezei hepatice de VLDL.

Alături de hiperlipoproteinemiile relativ frecvent întîlnite și deci mai bine cunoscute în medicina clinică redăm în continuare și alte cîteva anomalii mai rar întîlnite ale lipoproteinelor plasmatice.

I.4.2.3. ALTE ANOMALII ALE LIPOPROTEINELOR ȘI LIPIDELOR

I.4.2.3.1. *PREZENȚA DE LDL ANORMALE (beta sitosterolemia și xantomatoza cerebrotendinoasă)*

Astfel de anomalii au fost de curînd depistate la subiecți care prezentau xantoame tendinoase fără ca nivelul colesterolemiei să fie mult crescut. Persoanele afectate pot avea fie beta sitosterolemie fie xantomatoză cerebrotendinoasă. În primul caz, se ajunge, prin mecanisme încă insuficient elucidate, la o creștere anormală a absorbției de steroli de origine vegetală la nivelul intestinului subțire, ceea ce favorizează atît dezvoltarea xantomelor cît și apariția precoce a aterosclerozei coronare. Din fericire, atît creșterea nivelului plasmatic al sitosterolilor cît și apariția consecutivă a manifestărilor clinice poate fi influențată favorabil de o terapie orală cu colestiramină (vezi pag. 69).

În cazurile cu xantomatoză cerebrotendinoasă se acumulează în plasmă colestanol, un compus steroidic (similar colesterolului dar lipsit de dubla legătură și de lanțul lateral). Această anomalie rezultată dintr-un defect metabolic pe calea de sinteză a colesterolului și asociată cu o deprimare marcată a formării de acizi biliari, în speță acid chenodeoxicolic, evoluează cu xantomatoză tendinoasă și fenomene neurologice. Administrarea de chenodeoxicolat (250 mg de trei ori/zi) reduce concentrația plasmatică de colestanol și încetinește evoluția fenomenelor neurologice (45).

I.4.2.3.2. *DEFICITE DE CHILOMICRONI, VLDL, LDL (abetalipoproteinemia și hipobetalipoproteinemia)*

Scăderi marcate ale colesterolului și trigliceridelor se pot observa la bolnavi cu sindrom de malabsorbție sau cașexie. Dacă valorile acestor variabile scad însă sub 50 mg/dl (1,3 respectiv 0,6 mmol/l se poate bănui prezența unei *abetalipoproteinemii.* Anomalia este cauzată de un deficit genetic în sinteza apolipoproteinei B (deficit autosomal recesiv) și se caracterizează prin absența totală a lipoproteinelor conținînd în structura lor apo B-100 sau apo B-48 (VLDL, LDL, chilomicroni) (vezi pag. 20). Boala se asociază cu tulburări de absorbție a lipidelor, care se elimină prin fecale, și modificări de formă ale eritrocitelor, care au un aspect crenelat cu spini (acantocitoză). Mai grave sînt însă afectarea retinei (retinită pigmentară atipică) și tulburările nervoase caracterizate, în primul rînd, prin ataxie și avînd ca substrat morfologic o demielinizare a cordoanelor posterioare și laterale ale măduvei.

Recent s-a descris o așa-zisă *abetalipoproteinemie normotrigliceridemică* în care absorbția trigliceridelor și formarea chilomicronilor decurge normal iar apoproteina B-48 este prezentă în plasmă. Lipsind însă apo B-100, sinteza de VLDL se oprește, iar această clasă de lipoproteine ca și cea a LDL nu sînt detectabile în plasmă. Manifestările clinice care însoțesc anomalia sînt mai puțin severe decît în deficitul ambelor apoproteine B.

Hipobetalipoproteinemia familială este o boală de sine stătătoare și nu doar o formă minoră a afecțiunii descrise mai sus. Anomalia se transmite printr-un mecanism autosomal dominant iar heterozigoții prezintă nivele de LDL și VLDL aproximativ 50% din cele normale și nu dezvoltă manifestările clinice semnalate la subiecții cu abetalipoproteinemie. Homozigoții, proveniți din doi părinți cu hipobetalipoproteinemie, prezintă însă toate manifestările clinice ale abetalipoproteinemiei (25, 45).

Deși rare, astfel de cazuri au o deosebită importanță teoretică, realizînd adevărate experiențe ale naturii. Se vădește astfel importanța esențială a apo B-48 pentru absorbția lipidelor și a apo B-100 pentru transportul colesterolului și trigliceridelor sintetizate în ficat spre celulele țesuturilor extrahepatice. Se ridică pe drept cuvînt întrebarea dacă leziunile degenerative din sistemul nervos și din retină nu se datoresc tocmai perturbării transportului de lipoizi necesari refacerii membranelor celulare precum și deficitului de vitamine liposolubile. De altfel, administrarea parenterală a unor doze mari de vitamina A și E reduce progresiunea complicațiilor neurologice și oculare (25).

Pe de altă parte, existența subiecților cu hipobetalipoproteinemie (heterozigoți), cu nivel LDL și VLDL de aproximativ 50% din cel normal și fără nici o manifestare clinică, denotă că organismul uman ar putea face față necesităților cu o cantitate de LDL mult redusă față de cea considerată în prezent normală, pentru populația europeană și nordamericană.

Conform unor studii recente, o aceeași genă de structură, localizată la om pe cromozomul 2, codifică atît sinteza de apo B-100 (cu 4536 aminoacizi și produsă în ficat) cît și sinteza de apo B-48 (cu 2152 aminoacizi și produsă în mucoasa intestinală). Mecanismul de formare al apo B-48 reprezintă o formă particulară de prelucrare a acidului ribonucleic mesager (m RNA) pentru apo B și constă din introducerea unui cordon stop prematur care întrerupe formarea lanțului peptidic după aminoacidul cu numărul 2152.

Ca urmare a unor mutații, se poate ajunge însă la trunchieri ale apo B la alte nivele și implicit la producerea unor apo B anormale (apo B-46, apo B-37, apo B-39), a căror secreție decurge într-un ritm mai lent și avînd drept consecință diverse grade de hipobetalipoproteinemie (52).

I.4.2.3.3. *DEFICITUL DE HDL*

Concentrații joase se întîlnesc adeseori la bărbații sedentari, fumători, obezi și hipertrigliceridemici. Deficitele genetice de HDL evoluează însă cu scăderea foarte accentuată a acestor lipoproteine. S-a reușit iden-

tificarea mai multor defecte genetice evoluînd cu diferite grade de reducere a concentrației plasmatice a HDL (45).

Așa, de exemplu, *hipoalfalipoproteinemia* familială se caracterizează prin nivele medii ale colesterolului HDL de 26 mg/dl care sînt mult sub limita inferioară a normalului de 33 mg/dl. Anomalia transmisă genetic, printr-un mecanism autosomal dominant, este relativ frecvent întîlnită și evoluează cu o accentuată tendință la dezvoltarea precoce a aterosclerozei coronarelor. Defectul molecular responsabil de această anomalie nu este încă elucidat (45).

În așa-zisa *boală Tangier*, nivelul HDL scade mult mai mult, astfel încît heterozigoții prezintă valori de aproximativ 50% din cele normale iar homozigoții au HDL scăzut pînă la 1% din valorile medii normale. La aceștia din urmă, anomalia evoluează cu hipocolesterolemie (50—90 mg/dl), cu valori moderat crescute ale trigliceridelor și acumulare de esteri de colesterol în țesuturi și mai ales în organele bogate în macrofage. Se ajunge astfel la hepatosplenomegalie și adenopatii iar amigdalele primesc un aspect galben-portocaliu, ca un fagure de miere. La manifestările amintite se adaugă un ușor grad de opacifiere a corneei și o tendință moderată la dezvoltarea prematură a aterosclerozei coronariene.

S-a putut demonstra că în boala Tangier, scăderea HDL se asociază cu un nivel extrem de scăzut al apoproteinei A.I. Cu toate acestea, conținutul de apo A-I al celulelor epiteliului intestinal este normal, ceea ce ar putea sugera că anomalia menționată nu este consecința unui deficit de sinteză ci urmarea eliberării unei molecule modificate de apolipoproteină, susceptibilă să sufere un proces de catabolizare rapidă. Deși natura defectului molecular nu este încă descoperită, există totuși premisele unei explicații a modificărilor interesînd colesterolul plasmatic și tisular. Avînd în vedere că HDL asigură transportul colesterolului de la țesuturile extrahepatice spre ficat și că apo A.I este un cofactor al enzimei LCAT, care asigură esterificarea colesterolului plasmatic, acumularea de colesterol în țesuturi și scăderea valorilor sale plasmatice (colesterol esterificat) apare ca o consecință logică a deficitului de HDL și de apo A.I. Faptul că în țesuturi se găsesc mai ales esteri de colesterol se explică prin aceea că orice creștere a concentrației de colesterol liber în celulă activează ACAT (acil-CoA-colesterol acil-transferaza), enzima de esterificare intracelulară a colesterolului (25).

Recent s-a descris și un *defect combinat de apoproteină A.I* și *C.III*, asociat cu scăderea extrem de marcată a HDL, valori relativ scăzute ale colesterolului, xantomatoză cutanată și palpebrală, opacifierea moderată a corneei și o tendință accentuată la dezvoltarea precoce a aterosclerozei, Spre deosebire de boala Tangier deficitul de apo A.I și apo C.III nu se datoresc unei catabolizări excesiv de rapide, ci unui deficit de sinteză a acestor apoproteine (40).

Un deficit de HDL în care opacifierea corneei se situează pe prim plan este așa-numita *boală a ochilor de pește* (fish eye disease).

Defectul molecular responsabil de această anomalie este necunoscut (45).

S-au descris și cazuri în care opacifierea corneei și boala coronariană precoce se asociază în mod paradoxal cu un nivel mult crescut de HDL colesterol. S-a putut preciza că această hiperlipoproteinemie se datorește

unei creșteri izolate a subfracțiunii HDL_2, supraîncărcată cu lipide, ca urmare a unei perturbări în transferul esterilor de colesterol din HDL_2 spre VLDL (vezi pag. 39, și fig. 1.11) sau din cauza unui deficit de lipază hepatică și implicit a încetinirii captării hepatice a încărcăturii lipidice din HDL_2. În astfel de cazuri de *hiper HDL_2 colesterolemie familială* se ajunge la o blocare a transportului în revers a colesterolului și la o acumulare de lipide în țesuturi (31b) Anomalia descrisă este de natură a atrage atenția că nivelul crescut de HDL colesterol nu constituie neapărat un mecanism de protecție față de ateroscleroză. De fapt, semnificația creșterii HDL trebuie considerată în funcție de subfracțiunea crescută și de dinamica transportului în revers a colesterolului.

I.4.2.3.4. *DEFICITUL FAMILIAL DE LECITINCOLESTEROLACIL-TRANSFERAZĂ (LCAT)*

Deși această stare patologică nu este cauzată de un defect primar al lipoproteinelor, ea evoluează cu un important deficit de HDL și manifestări clinice destul de asemănătoare cu cele mai sus menționate. Asemănarea nu trebuie să surprindă avînd în vedere că HDL și enzima LCAT realizează o unitate funcțională (vezi pag. 39). De fapt, în cazurile descrise de autorii scandinavi, era prezentă ateroscleroza și opacifierea corneei, la care se adăugau proteinurie și insuficiență renală progresivă precum și un sindrom anemic normocrom. Investigațiile de laborator evidențiază o scădere marcată a esterilor de colesterol și a lizolecitinei, în timp ce colesterolul liber și lecitina sînt crescute, iar activitatea LCAT, responsabilă de esterificarea în plasmă a colesterolului, este nedecelabilă. Boala evoluează adeseori cu hiperlipemie, colesterolemia (colesterol liber) fiind de 200—600 mg/dl, fosfolipidele (lecitina) ajungînd la 300—800 mg/dl, iar trigliceridele oscilînd între 120—1800 mg/dl.

Examenul electroforetic al lipoproteinelor evidențiază o scădere exprimată a fracțiunii $alfa_1$ (o mică cantitate de HDL migrînd întîrziat în domeniul $alfa_2$), fracțiunea prebeta se contopește cu beta care apare mult lățită, înglobînd și cantități variabile de LpX bogată în colesterol liber și lecitină (vezi pag. 19). Totodată hematiile bolnavilor prezintă modificări de formă cu aspecte în țintă, cauzate de o acumulare de colesterol liber și lecitină în membrana eritrocitară. Acumulări de colesterol și formarea de celule spumoase se constată și în măduva osoasă și în rinichi, fenomene care sînt în măsură a explica anemia și tulburările renale. Opacifierea corneei pare a se datora tot unei infiltrări de colesterol în toate straturile stromei. Deși rar întîlnită, această anomalie genetică cu caracter autosomal recesiv prezintă o deosebită importanță, demonstrînd rolul LCAT în transportul colesterolului (39).

I.4.2.3.5. *DEFICITUL DE HIDROLIZĂ INTRACELULARĂ A ESTERILOR DE COLESTEROL*

Deși nici această anomalie nu este cauzată de o mutație care ar afecta lipoproteinele sau receptorii celulari ai acestora, am considerat utilă prezentarea ei aici deoarece evoluează cu acumulări importante de

Tabel 1.6b

Prezentare schematică a tezaurismozelor cu sfingolipide

Denumirea bolii	Lipoidul acumulat	Compoziția lipoidului	Defectul enzimatic	Organele în care are loc acumularea și manifestări clinice consecutive
Sfingomielinoze (Niemann—Pick)	sfingomielină	acid gras-sfingozină-fosforilcolină	sfingomielinază	ficat, splină, unele zone din creier retardare fizică și mintală
Gangliozidoze neuroviscerale	gangliozid	acid gras-sfingozină-galactoză-acetilgalactozamină-galactoză	galactozidază specifică	ficat, creier idioție amaurotică
Tay—Sachs	gangliozid (fără galactaza terminală)	acid gras-sfingozină-galactoză-acetilgalactozamină	N-acetilgalactozidază specifică	creier retardare mintală pînă la idioție amaurotică
Boala Gaucher	glicozilceramida (cerebrozid)	acid cerebronic (un acid gras hidroxilat) sfingozină glucoză	glucocerebrozidază	ficat, splină, ganglioni limfatici hepatosplenomegalie hipersplenism (leucopenie, trombocitopenie)
Boala Fabry	trihexozidceramida	acid cerebronic-sfingozină-glucoză-galactoză-galactoză	galactozidazoceramid trihexozidază	rinichi (glomeruli și tubi), ficat, splină, vase insuf. renală, tromboză coronar.
Leucodistrofie meta cromatică	sulfatid (cerebrozid-sulfat)	acid cerebronic-sfingozină-galactozo-3-sulfat	sulfatază	sistem nervos central și rinichi manifestări date de demielinizare (paraplegie spastică, retardare mintală, fenomene cerebeloase)

esteri de colesterol și trigliceride în diverse țesuturi. Defectul molecular constă într-un deficit sever de colesterilesterhidrolază acidă (cunoscută și sub numele de esterază acidă, lipază acidă). Drept urmare a acestui deficit, celulele subiecților afectați nu sînt în măsură să hidrolizeze esterii de colesterol pe care diversele celule, prevăzute cu receptori apo B.100/E îi captează și îi internalizează împreună cu LDL. Acumularea consecutivă de esteri de colesterol în lizozomi realizează două boli de gravitate deosebită; boala Wolman și boala stocării esterilor de colesterol. În *boala Wolman* (autosomal recesivă), supraîncărcarea cu esteri de colesterol este deosebit de gravă și se asociază cu calcifierea glandelor suprarenale, avînd o evoluție letală înaintea vîrstei de un an. *Boala stocării esterilor de colesterol,* transmisă tot autosomal recesiv, este însă mai benignă, iar unii subiecți afectați au supraviețuit peste vîrsta de 40 ani. Nu se cunosc încă mecanismele de care depinde gravitatea consecințelor unui deficit de colesterolesterhidrolază acidă (25).

I.4.2.3.6. *ANOMALII ALE SFINGOLIPIDELOR (tezaurismoze lipidice)*

Acest grup de îmbolnăviri rare, cu caracter familial, au la bază acumulări de sfingolipide în diverse țesuturi. Sfingolipidele constituie un grup heterogen de compuși avînd în comun un alcool aminat cu 18 atomi de carbon denumit sfingozină. Legarea sfingozinei într-o legătură amidică cu un acid gras (N-acilsfingozina) formează așa-zisele ceramide care constituie unitatea de bază a sfingolipidelor. Întrucît tezaurismozele lipidice nu se reflectă în modificări ale lipoproteinelor plasmatice și beneficiază în mică măsură de aportul laboratorului clinic, ne limităm a reda, sub formă succintă de tabel, cîteva aspecte al acestui capitol de patologie (vezi tabelul 1.6 b).

I.5. BAZELE BIOCHIMICE ALE TERAPIEI HIPOLIPEMIANTE

Indicațiile majore ale terapiei hipolipemiante sînt:

1) Pancreatita recurentă (survenind în timpul I și V);
2) Prezența xantoamelor;
3) Profilaxia primară și secundară a aterosclerozei.

I.5.1. MĂSURI IGIENO-DIETETICE

Avîndu-se în vedere că dezvoltarea unei hiperlipemii depinde nu numai de factori genetici dar și de obiceiuri alimentare însușite încă din copilărie, profilaxia aterosclerozei și a hiperlipoproteinemiilor poate fi considerată ca o problemă de pediatrie și de educație sanitară la vîrsta tînără.

Este important de știut că în numeroase cazuri un regim igienodietetic adecvat este în măsură să influențeze în mod favorabil hiper-

lipemia, mai ales atunci cînd în producerea acestei anomalii au contribuit factori de mediu ca, de exemplu, o alimentaţie bogată în grăsimi şi, în general, o alimentaţie hipercalorică, sedentarismul şi stările de stres psihoemoţional.

În principiu, atît regimul igieno-dietetic cît şi eventuala medicaţie ar trebui să fie adaptate la mecanismul de producere al hiperlipoproteinemiei. Aşa, de exemplu, în cazurile de hipertrigliceridemie endogenă, asociate cu obezitate, regimul dietetic trebuie să fie nu numai sărac în grăsimi animale dar şi hipocaloric, insistîndu-se asupra reducerii glucidelor rafinate în vederea obţinerii unei reduceri în greutate. În astfel de cazuri, se recomandă mese frecvente dar sărace în calorii, conţinînd mai ales peşte, carne slabă, crudităţi sub formă de salate cu uleiuri vegetale.

În cazurile de hipercolesterolemie se insistă asupra reducerii consumului de colesterol şi grăsimi saturate.

American Heart Association recomandă o dietă în care grăsimile să nu depăşească 30% din totalul caloriilor, raportul dintre grăsimile saturate şi cele nesaturate să fie în jur de 1, iar colesterolul din alimente să fie sub 300 mg/zi, (vezi pag. 24 pentru alimentele bogate în colesterol). Utilitatea unui astfel de regim este justificată astăzi din punct de vedere teoretic, în lumina datelor privind variaţia receptorilor pentru LDL în funcţie de alimentaţie (vezi pag. 56), iar studiile prospective au demonstrat o reducere a colesterolului şi a incidenţei infarctului miocardic la grupurile populaţionale care au aderat în mod susţinut la dieta menţionată (41, 48, 58). Nu există dovezi că efortul fizic ar scădea lipidele serice, cu excepţia cazurilor de obezitate în care gimnastica medicală produce o reducere a surplusului ponderal. Dat fiind însă că sportul disciplinează reacţiile neurovegetative şi contribuie la reducerea stărilor de încordare psihoemoţională, exerciţiul fizic moderat ar trebui recomandat nu numai tuturor hiperlipemicilor dar şi tuturor subiecţilor cu tendinţă la sedentarism.

Regimurile dietetice severe, de tipul celui recomandat de American Heart Association, ar trebui aplicate mai ales acelor subiecţi hiperlipemici în a căror familie s-au semnalat frecvente cazuri de infarct miocardic sau accidente vasculare cerebrale şi care ar putea fi deosebit de susceptibili la efectele nocive ale LDL. Aplicarea unui astfel de regim populaţiei generale nu ni se pare justificată din următoarele motive:

a) Majoritatea subiecţilor nu aderă cu plăcere la un regim extrem de sărac în lipide şi destul de insipid;

b) Nu toţi subiecţii sînt predispuşi să dezvolte hiperlipemie în urma unei diete obişnuite, în ţările industrializate; există de fapt subiecţi la care nivelul de LDL nu creşte, chiar atunci cînd urmează o dietă bogată în lipide;

c) La unele persoane, arterele par să prezinte o rezistenţă particulară faţă de nivele crescute de LDL. Aşa de exemplu, 10—20% din subiecţii cu hipercolesterolemie familială (heterozigoţi) depăşesc vîrsta de 60 de ani fără a prezenta semne de insuficienţă coronariană;

d) În sfîrşit, nu se poate exclude posibilitatea ca un regim prea sărac în lipide să ducă la alte îmbolnăviri a căror dezvoltare este astăzi prevenită tocmai printr-un consum moderat de lipide.

Este recomandabil ca atît indicațiile pentru un regim igieno-dietetic, cît și evaluarea eficienței acestuia să se facă pe baza unui control de laborator cît mai complet al spectrului lipidelor serice, iar în cazul cînd rezultatele nu sînt satisfăcătoare, să se treacă la medicația hipolipemiantă.

I.5.2. MEDICAMENTE CU EFECT HIPOLIPEMIANT

I.5.2.1. DATE GENERALE

Este important de știut că toate medicamentele hipolipemiante au și unele efecte secundare și că nici unul din aceste medicamente nu este pe deplin eficient în toate tipurile de hiperlipemie. În mare, astfel de medicamente ar putea fi împărțite în trei categorii: 1) Agenți care reduc sinteza de VLDL, ca de exemplu acidul nicotinic; 2) Agenți care accelerează procesele de clearence al VLDL, ca de exemplu clofibratul și gemfibrozilul; 3) Agenți care accelerează catabolizarea LDL, așa cum sînt colestiramina și colestipolul (45).

La substanțele de mai sus, se mai pot adăuga recent descoperiții inhibitori de HMG CoA-reductază, care frînează sinteza de colesterol încă în etapele inițiale.

În ultimii ani, s-au descris rezultate favorabile cu preparatul probucol care previne oxidarea LDL și reduce procesul de formare a celulelor spumoase în peretele arterial.

I.5.2.2. COLESTIRAMINA ȘI COLESTIPOLUL

Acești agenți sînt rășini schimbătoare de ioni care, avînd numeroase grupări electropozitive, leagă în intestin acizii biliari electronegativi împiedicînd reabsorbția lor și blocînd circuitul hepatoenterohepatic al acestora. Ca urmare a depleției de acizi biliari o cantitate mai mare de colesterol va fi consumată pentru transformarea în astfel de compuși, iar celulele hepatice își cresc numărul de receptori LDL (vezi fig. 1.17). Luate pe cale orală în doză de 8 g/zi (doza maximă fiind de 32 g/zi), preparatele de colestiramină (Questran, Cuemid) produc o scădere cu aproximativ 10—25% a colesterolului din LDL. Este bine ca acest tratament, aplicat în hiperlipoproteinemia tip II-a, să fie inițiat cu doze mici, crescîndu-le apoi progresiv.

Colestipolul în doze de 3×5 g/zi acționează prin aceleași mecanisme, avînd o eficacitate similară iar efectele secundare, constînd din constipație alternînd cu diaree, senzație de balonare, flatulență și greață sînt aceleași ca în cazul colestiraminei. Este important de știut că rășinile mai sus menționate interferează cu absorbția digitalicelor, a tiroxinei, fenilbutazonei, tetraciclinei și a preparatelor de antagoniști ai vitaminei K. Se limitează totodată absorbția vitaminelor liposolubile. Pe lîngă acest inconvenient, terapia cu colestipol sau colestiramină poate duce la o creștere a nivelului seric de trigliceride mai ales în cazurile în care

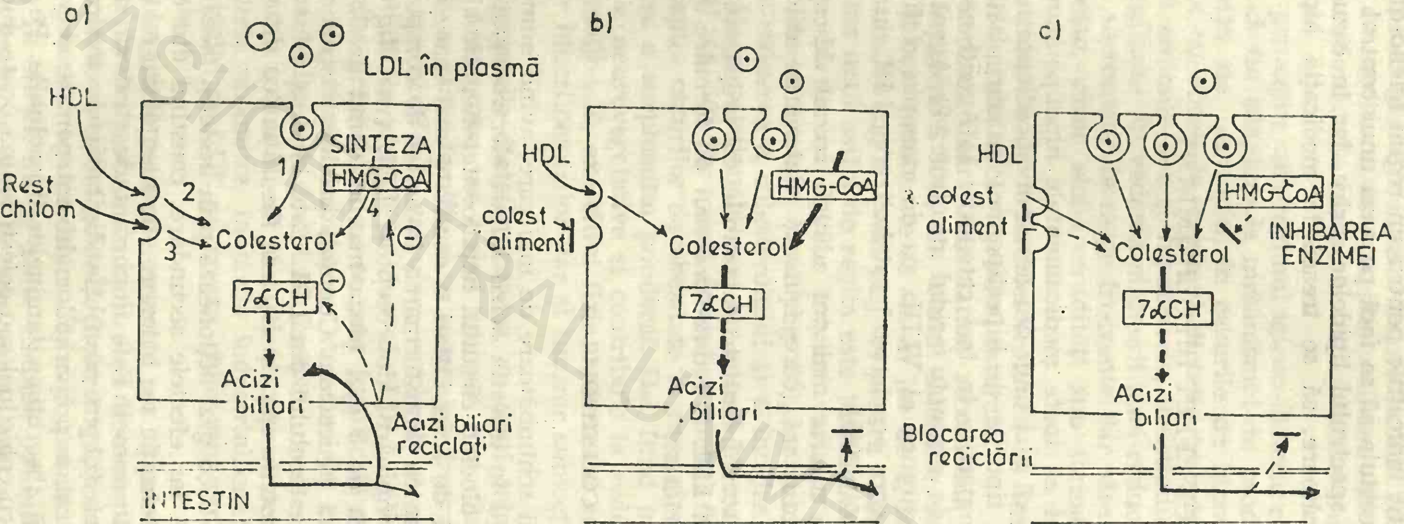


Fig. 1.17. Principii de terapie în cazurile de hipercolesterolemie familială (heterozigoți) prin încercarea de creștere a numărului de receptori față de LDL. a) la subiectul netratat, colesterolul hepatic poate proveni din captarea LDL și IDL (1), din captarea colesterolului din HDL (2), din colesterolul alimentar captat cu resturile de chilomicroni (3) sau din sinteza endogenă (4) în care enzima HMG-CoA reductază joacă un rol cheie. O bună parte a colesterolului se transformă în acizi biliari care se elimină prin bilă în intestin dar sînt reciclați în proporție de peste 95%. Acizii biliari reciclați exercită un efect de feed-back negativ (— → ⊖) reprimînd nu numai 7 alfa colesterol hidroxilaza (7 alfa CH), enzima cheie în sinteza acizilor biliari, dar și HMG-CoA reductaza. b) prin reducerea aportului alimentar de colesterol și mai ales prin blocarea reabsorbției acizilor biliari cu colestiramină sau colestipol se creează o nevoie crescută de colesterol, ceea ce duce la sinteza de receptori pentru captarea LDL din plasmă. Acest efect este însă parțial contracarat de dereprimarea HMG-CoA reductazei și de accelerarea consecutivă a sintezei endogene de colesterol. c) dacă se administrează în plus și un preparat care inhibă competitiv HMG-CoA reductaza (exemplu compactin sau mevinolin), se stimulează suplimentar producerea de receptori și captarea de LDL cu scăderea consecutivă a nivelului acestora în plasmă. În condițiile unei astfel de terapii, măsurile dietetice pot fi relaxate.

există o oarecare tendință la hipertrigliceridemie endogenă. Eficacitatea relativ redusă a rășinilor fixatoare de anioni se poate explica, cel puțin în parte, prin dublul răspuns al hepatocitelor, la creșterea utilizării de colesterol pentru refacerea rezervorului de acizi biliari. Pe de-o parte se sporește, așa cum s-a arătat mai sus, numărul de receptori pentru LDL, dar pe de altă parte se induce sinteza de HMG-CoA reductază și deci producția hepatică de colesterol. Nu este exclus ca în strînsă legătură cu creșterea producției endogene de colesterol să se stimuleze și secreția trigliceridelor încorporate în VLDL. Din aceste motive este recomandabil ca terapia cu preparate de colestiramină să fie asociată cu acid nicotinic, care reduce secreția de VLDL (vezi pag. 72). O perspectivă optimistă se deschide astăzi prin posibilitatea asocierii colestiraminei cu inhibitori de HMG-CoA reductază.

I.5.2.3. INHIBITORII DE HMG-CoA REDUCTAZĂ

Încă din 1975, Goldstein și Brown au identificat o serie de compuși analogi, oxigenați, de colesterol (de exemplu 7-cetocolesterolul, 6-cetocolesterolul și 25-hidroxicolesterolul) care au puternice efecte represive prin feed-back negativ asupra HMG-CoA reductazei, în culturile de celule normale și chiar cu celule provenite de la bolnavi cu hipercolesterolemie familială (homozigoți). Deoarece acești analogi steroidici ar putea interfera și cu procesele de utilizare a colesterolului în formarea membranei celulare sau a hormonilor steroizi ori acizilor biliari, importanța lor este pur teoretică. Recent s-au extras din anumite mucegaiuri substanțe nesteroide care inhibă competitiv HMG-CoA reductaza. Astfel de compuși, ca de exemplu compactinul (ML 236 beta) extras din penicilium citrinum și mevinolina (monocolin K), la rîndul ei extrasă dintr-o specie de monascus, posedă o catenă laterală foarte asemănătoare beta-hidroxi-beta-metilglutaril CoA care prezintă substratul natural al HMG-CoA reductazei (vezi pag. 25). Compușiii amintiți se leagă în centrul activ al enzimei și îi inhibă puternic activitatea. Administrate împreună cu colestiramina unor subiecți cu hipercolesterolemie familială (tip II-a heterozigoți), preparatele amintite au scăzut colesterolemia aproape la jumătate (de la 356 ± 14 la 217 ± 10 mg/dl) în decurs de 12 săptămîni, fără să fi produs efecte secundare decelabile. O astfel de terapie a dus și la scăderea trigliceridelor serice iar explorări efectuate cu LDL marcate au demonstrat că scăderea acestor particule este determinată de o creștere a receptorilor apo B-100/E (vezi fig. 1.17). Dacă observațiile de lungă durată vor fi în măsură să excludă efectele colaterale nocive, terapia mai sus menționată se va dovedi deosebit de utilă în cazul heterozigoților cu hipercolesterolemie familială (31). Se pare că efectele colaterale sînt de fapt reduse iar astăzi acești inhibitori ai HMG-CoA reductazei se aplică frecvent în terapie sub denumiri ca de exemplu Lovastatin sau MK 733.

Așa cum este însă de așteptat, homozigoții afectați de această anomalie și lipsiți complet de gena care codifică sinteza receptorilor LDL nu răspund la terapia combinată cu colestiramină și inhibitori de HMG-CoA reductază. Amintim aici, cu caracter informativ, încercarea de a

corecta lipsa de receptori LDL la homozigoţi prin transplantul de ficat cu un conţinut normal de receptori. Operaţia, efectuată asupra unei fetiţe de 6 ani cu hipercolesterolemie familială deosebit de severă (colesterolemia de 1200 mg/dl) şi care suferise deja cîteva infarcte miocardice, a necesitat şi un transplant de inimă. După mai bine de 6 luni de la operaţie, nivelul colesterolului s-a menţinut în jur de 300 mg/dl, fapt ce demonstrează că receptorii de pe hepatocitele ficatului transplantat îşi păstrează capacitatea de a capta şi cataboliza particulele de LDL din circulaţie.

I.5.2.4. ACIDUL NICOTINIC (niacina)

Aceste preparate (Niconacid, Xavin), care limitează, printr-un mecanism încă neelucidat, sinteza şi secreţia de VLDL, se utilizează pentru terapia hiperlipoproteinemiilor tip II-b, III, IV şi V. Astfel de medicamente sînt însă contraindicate la subiecţii cu afecţiuni hepatice sau cu boală ulceroasă. Ele pot produce eriteme, prurit, uscăciunea tegumentelor şi iritaţii oculare, fenomene care pot fi înlăturate prin administrarea unei tablete de aspirină zilnic. Terapia trebuie începută cu o doză de 100 mg de trei ori pe zi, în timpul meselor, crescîndu-se progresiv pînă la o doză medie de 1 g, de trei ori pe zi (doza maximă fiind de 9 g/zi). Există şi forme de acid nicotinic retard care sînt mai bine tolerate.

Acidul nicotinic produce o scădere cu aproximativ 40% a trigliceridelor şi colesterolului din VLDL, în timp ce LDL colesterolul scade cu 20% iar HDL colesterolul creşte cu 20%. Deoarece această terapie poate duce la creşteri ale transaminazelor, acidului uric şi glucozei sanguine, controlul de laborator trebuie să urmărească nu numai comportarea lipidelor serice ci şi a parametrilor menţionaţi.

I.5.2.5. CLOFIBRATUL (acidul p-clorofenoxiizobutiric)

Administrat în doză de 1 g, de două ori pe zi, clofibratul reduce cu aproximativ 30% trigliceridele şi colesterolul din VLDL, avînd o slabă influenţă asupra LDL colesterolului şi producînd o uşoară creştere a HDL colesterolului. Prin efectul de accelerare a catabolismului VLDL (printr-un mecanism încă neelucidat), particulele de LDL pot creşte în unele cazuri care au un echipament deficitar de receptori pentru LDL. Clofibratul produce totodată o accelerare a fibrinolizei, o diminuare a fibrinogenemiei, o scădere a factorului XIII stabilizator al fibrinei şi o tendinţă de normalizare a hiperreactivităţii plăcuţelor sanguine. Prin aceste efecte, clofibratul pare a fi util în terapia hiperlipoproteinemiilor tip IIb, III şi IV. Pe de altă parte, pot să apară efecte colaterale nedorite, între care menţionăm miozita, potenţarea acţiunii antagoniştilor de vitamină K şi, în rare cazuri, alterarea funcţiilor hepatice. Efectul cel mai neplăcut al terapiei cu clofibrat este favorizarea litiazei biliare. Astfel, într-un studiu prospectiv de amploare s-a constatat că, deşi clofibratul reduce semnificativ incidenţa coronaropatiei, mortalitatea globală nu a scăzut, ba chiar a crescut datorită, în primul

rînd, afecţiunilor biliare. Din aceste motive, terapia cu clofibrat trebuie recomandată doar acelor subiecţi cu hiperlipemiile menţionate care nu au răspuns favorabil la regimul igieno-dietetic sau la alte medicaţii, cum ar fi acidul nicotinic sau gemfibrozilul.

I.5.2.6. GEMFIBROZILUL

Acest agent are o structură asemănătoare cu a clofibratului. Administrat pe cale orală, în doze de 600 mg, de două ori pe zi, gemfibrozilul reduce nivelul VLDL, are o influenţă mai redusă asupra LDL şi creşte substanţial nivelul HDL. Ca şi clofibratul, el este recomandat pentru reducerea hipertrigliceridemiilor severe, avînd însă un efect litogenic mai puţin exprimat, asupra bilei. Gemfibrozilul nu este însă recomandabil persoanelor cu afecţiuni hepatice sau renale.

I.5.2.7. PROBUCOLUL

Întrucît administrarea orală de probucol (2×500 mg/zi) produce nu numai o scădere a LDL (cu aproximativ 20%) dar şi a HDL (cu aproximativ 30%), utilizarea acestui preparat a fost privită iniţial cu multă rezervă (45). Studii ulterioare, extinse pe o perioadă de 10 ani, sugerează însă că probucolul ar putea deschide o nouă eră în strategia farmacologică a combaterii aterosclerozei, putînd produce nu numai o întîrziere a dezvoltării plăcilor ateromatoase dar chiar şi o regresiune a leziunilor. Fiind un compus liposolubil, cu proprietăţi antioxidante şi o structură chimică similară hidroxitoluenului dibutilat, probucolul se include în particulele de LDL şi previne oxidarea acestora în peretele arterial. Ca urmare, se reduce efectul chemotactic al LDL oxidate faţă de monocite şi implicit se limitează procesul de formare a celulelor spumoase (vezi pag. 76 şi fig. 1.18). Colesterolul din particulele LDL pătrunse în peretele vascular, dar neoxidate şi neincluse în macrofage, poate fi apoi preluat de către HDL şi transportat spre ficat, unde are loc eliminarea sa (vezi pag. 38 şi fig. 1.11) iar probucolul favorizează şi acest proces. De fapt, scăderea nivelului plasmatic de HDL colesterol sub acţiunea probucolului nu se produce printr-o diminuare a sintezei unor astfel de particule ci prin accelerarea captării hepatice a încărcăturii lipidice din HDL 2, probabil în legătură cu stimularea de către probucol a activităţii lipazei hepatice. În acest context, scăderea HDL trebuie privită ca o expresie a favorizării transportului în revers a colesterolului. Mecanismul descris ca şi prevenirea oxidării LDL sînt în măsură să explice regresiunea aterosclerozei în urma terapiei cu probucol (22 b).

I.5.2.8. ALTE MEDICAMENTE CU EFECT HIPOLIPEMIANT

Există multe preparate cu efecte hipolipemiante mai mult sau mai puţin exprimate şi care au fost experimentate sau sînt în curs de evaluare. Aşa de exemplu, administrarea pe cale orală a antibioticului *neomicină* (2 × 1 g/zi) a dus la o

reducere cu 21% a colesterolului la pacienţi cu hiperlipoproteinemie tip II-a, fiind totodată bine tolerat. Chiar şi *benzodiazepinele* (25 b) s-au dovedit a avea un moderat efect hipolipemiant în condiţii experimentale şi în testări clinice (de exemplu, Napoton, Diazepam). Amintim că studiile prospective privind eficienţa terapiei cu *D-Tiroxină* au arătat că, în ciuda scăderii LDL, incidenţa morţii subite a fost mai mare decît la lotul netratat. Nu este exclus ca acest efect negativ să se fi exercitat prin intermediul creşterii nevoilor de oxigen ale miocardului sub efectul D-tiroxinei, care, deşi mai slab decît în cazul L-tiroxinei, nu este neglijabil.

1.5.2.9. CONSIDERAŢII CRITICE ASUPRA TERAPIEI HIPOLIPEMIANTE

Aşa cum se poate constata, toate medicamentele hipolipemiante au şi efecte colaterale nedorite. Se ridică pe bună dreptate întrebarea dacă beneficiile realizate de acest gen de terapie contrabalansează efectele nedorite deja menţionate. Cu alte cuvinte, este oare în măsură terapia hipolipemiantă să reducă incidenţa accidentelor coronariene acute sau măcar să amelioreze calitatea vieţii bolnavilor cu ateroscleroză coronariană. Există la ora actuală o serie de studii prospective care evaluează beneficiile scăderii postterapeutice a lipidelor serice. Rezultatele par a fi încurajatoare,cu excepţia studiului amintit, care indică o creştere a incidenţei morţii subite în urma terapiei cu D-tiroxină, şi a unui studiu amplu întreprins de Organizaţia Mondială a Sănătăţii care arată că, deşi terapia de durată cu clofibrat reduce incidenţa infarctului miocardic, se ajunge, în cele din urmă, la o creştere a mortalităţii prin alte boli decît cele cardiovasculare.

În schimb, terapia cu acid nicotinic a scăzut semnificativ recurenţa infarctului miocardic iar un alt studiu prospectiv de amploare a demonstrat reducerea incidenţei coronaropatiilor la grupe de populaţie supuse unui regim dietetic şi tratamentului cu colestiramină pentru reducerea colesterolemiei. De altfel, ca rezultat al măsurilor profilactice de ordin dietetic, asociat cu renunţarea la fumat şi cu tratamentul corect al hipertensiunii arteriale, mortalitatea prin infarct miocardic a scăzut într-o serie de ţări în care populaţia a aderat la măsurile amintite (31, 41, 45, 47, 48). Se pun de asemenea mari speranţe în eficienţa terapiei cu probucol (22 b).

Astfel de rezultate deschid o perspectivă optimistă şi aduc totodată argumente pentru rolul anomaliilor metabolismului lipidic în patogeneza aterosclerozei.

Tabelul 1.7.

Indicaţii dietetice şi terapeutice în funcţie de tipul de hiperlipoproteinemie

Tip	Indicaţii dietetice	Medicaţie hipolipemiantă
I	Reducerea grăsimilor. Se admit grăsimi conţinînd acizi graşi cu lanţ mediu de atomi de carbon (lactate).	—

Tip	Indicaţii dietetice	Medicaţie hipolipemiantă
II a	Reducerea consumului de colesterol şi grăsimi saturate (de origine animală). Se recomandă grăsimi nesaturate (uleiuri vegetale).	Colestiramină, colestipol Acid nicotinic. În stadiu de experiment clinic: compactin, mevinolin (lovastatin)
III	Slăbire. Reducerea colesterolului şi grăsimilor saturate. Se recomandă grăsimi nesaturate.	Gemfibrozil, acid nicotinic; clofibrat, doar dacă nu se obţin rezultate cu regim sau cu preparate amintite anterior.
II b-IV	Slăbire. Reducerea colesterolului şi a grăsimilor saturate. Se admit grăsimi nesaturate. Reducerea zaharurilor rafinate. Evitarea alcoolului.	Acid nicotinic, Gemfibrozil, Lovastatin. Clofibrat doar în cazurile rezistente la altă terapie hipolipemiantă.
V	Slăbire. Reducerea grăsimilor şi a zaharurilor rafinate. Evitarea alcoolului. Regim hiperprotidic.	Tatonare cu acid nicotinic, gemfibrozil.

I.6. LIPIDELE ŞI ATEROGENEZA

Deşi există, în general, un consens după care anumite anomalii ale lipoproteinelor serice reprezintă un factor de risc pentru dezvoltarea leziunilor aterosclerotice, mecanismele prin care se instalează aceste leziuni sînt controversate (49, 51).

Discutarea diverselor ipoteze şi speculaţii privind mecanismul aterogenezei ar depăşi scopul prezentului capitol. Ne vom limita deci doar la relatarea unor observaţii verificate, încercînd să le corelăm cu anomaliile metabolismului lipidic. În esenţă, modificările constatate în plăcile aterosclerotice pot fi astfel sistematizate:

a) Acumularea intra- şi extracelulară de material lipidic, mai ales colesterol, precum şi prezenţa apolipoproteinei B;

b) Migrarea unor monocite din sîngele circulant în subendoteliu;

c) Proliferarea celulelor musculare netede ale peretelui arterial;

d) Acumularea de ţesut conjunctiv (fibre de colagen şi proteoglicani);

e) Formarea de microtrombi murali fibrinoplachetari care au o mare tendinţă de încorporare în straturile subendoteliale ale peretelui vascular;

f) Prezenţa complexului de atac al membranei (complexul C_{5b-9} al sistemului complement) pe membrana celulelor în curs de liză;

g) Prezenţa de leziuni ale endoteliilor cu sau fără zone de reendotelizare, indicînd procese de reparaţie, prin migrarea şi proliferarea celulelor endoteliale.

I.6.1. ACUMULĂRI DE COLESTEROL ÎN PERETELE VASCULAR

Acest proces, care rezultă dintr-un dezechilibru dintre pătrunderea de LDL prin endotelii şi mecanismele care asigură îndepărtarea excesului de colesterol, nu poate fi înţeles fără a ţine seama de rolul elementelor celulare. De fapt, plăcile aterosclerotice sînt umplute cu celule gunoier (scavenger cells) care, înglobînd mari cantităţi de colesterol, se transformă în celule spumoase. Astfel de celule provin fie din macro-

transformă în celule spumoase. Astfel de celule provin din macrofagele peretelui arterial, fie din monocitele sîngelui circulant care pătrund în perete la nivelul unei leziuni endoteliale sau chiar prin diapedeză. Există astăzi dovezi că macrofagele captează cu aviditate mai ales particulele de LDL modificate (acetilate, malonilate, succinilate, peroxidate, glicozilate sau cuplate cu proteoglicani). Astfel de modificări pot afecta fie componentele lipidice, fie apoproteina B. Așa de exemplu, peroxidarea radicalului lizină al apo B și a fosfolipidelor din LDL are loc sub acțiunea radicalilor superoxizi generați de macrofage. Pe de altă parte, malonilarea radicalului lizină al apo B poate avea loc sub acțiunea malondialdehidei rezultată în cursul producerii de prostaglandine, în țesuturile lezate sau în trombii plachetari. În principiu, radicalul epsilon-amino al lizinei din apo B ar putea reacționa cu alți compuși generați și de plăcuțe și de macrofage, așa cum sînt leucotrienele, produse sub acțiunea lipoxigenazei, iar plasma diabeticilor conține cantități variabile de LDL glicozilate. Merită semnalat și faptul că lichidul extracelular al tendoanelor și aortei conține liziloxidază, o enzimă cu rol în legarea transversală a fibrelor de colagen și care ar putea oxida și radicalii lizină ai LDL. Toate reacțiile menționate cresc încărcarea electronegativă a particulelor LDL și favorizează captarea lor de către macrofage prin intermediul unor receptori speciali. O caracteristică importantă a acestor receptori constă în faptul că nu sînt reglabili, permițînd acumulări mari de LDL care depășesc capacitatea celulei de a le metaboliza, ajungîndu-se astfel la formarea de celule spumoase (5, 36).

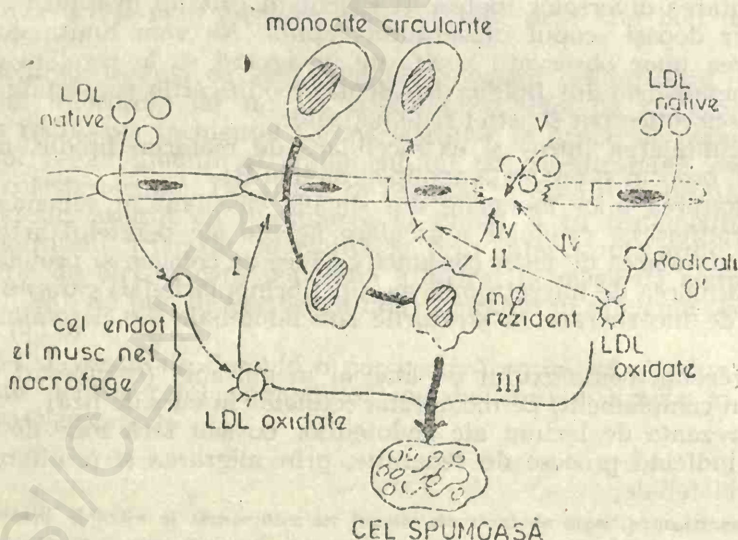


Fig. 1.18. **Rolul particulelor de LDL modificate oxidativ în procesul de formare a celulelor spumoase; I-LDL oxidate atrag monocitele; II macrofagele încărcate cu LDL oxidate își reduc motilitatea; III supraîncărcarea cu LDL oxidate a macrofagelor duce la formarea celulelor spumoase; IV LDL oxidate (și macrofagele încărcate cu astfel de particule) exercită un efect toxic asupra endoteliilor. De notat că noțiunea de leziune endotelială nu implică o denudare, ci doar o disfuncție a celulelor endoteliale; V — accentuarea insudării de plasmă incluzînd particule de LDL. După D. Steinberg și colab. (48 b), cu unele modificări. mØ = macrofag.**

Mecanismele care tind să prevină acumulările excesive de colesterol (mai ales sub formă de esteri) sînt şi ele în mare măsură dependente de elementul celular. Astfel, în condiţiile unei transcitoze moderate a LDL, macrofagele din zona subendotelială, care au înglobat lipoproteinele, părăsesc peretele arterial, prin diapedeză (printre celulele endoteliale) trec în circulaţie şi sînt blocate în sistemul reticulohistiocitar (splină, ganglioni).

De notat însă că particulele LDL oxidate inhibă mobilitatea macrofagelor care rămîn astfel blocate în peretele arterial continuînd să înglobeze LDL şi transformîndu-le în celule spumoase. Totodată LDL oxidate şi încorporate în macrofage stimulează metabolizarea acidului arahidonic în aceste celule, ceea ce duce la eliberarea de prostaglandine şi leucotriene cu efect proinflamator (48 b). Acelaşi efect proinflamator, avînd ca rezultat creşterea permeabilităţii vasculare şi exudarea de plasmă în spaţiul subendotelial, îl exercită şi diversele monokine produse de monocit/macrofag, aşa cum sînt interleukina (iL-1) şi factorul de necroză tumorală (TNF). Mecanismele care duc la formarea celulelor spumoase sînt ilustrate în figurile 1.18 şi 1.19.

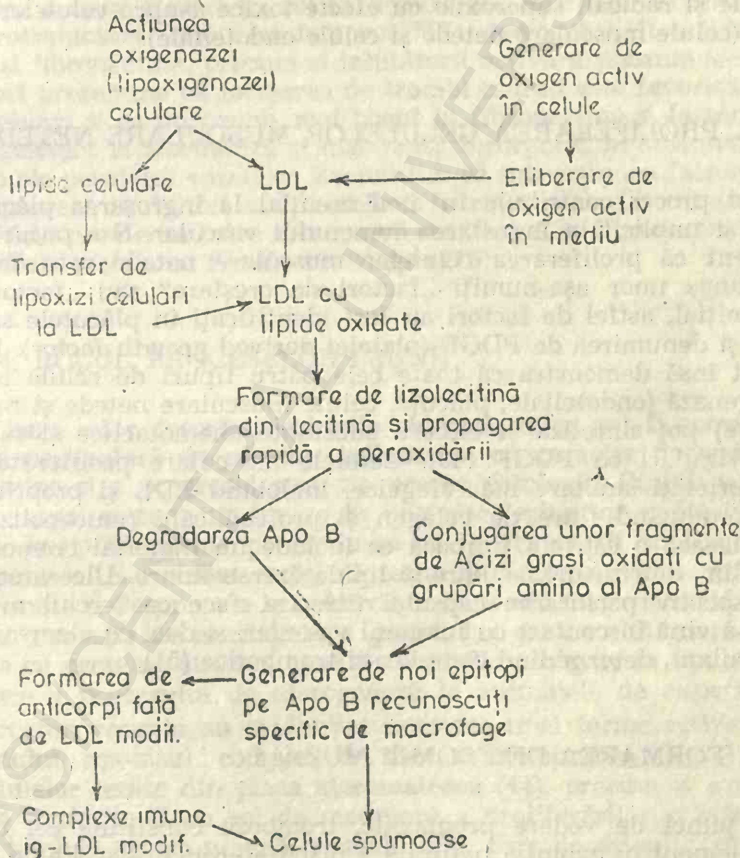


Fig. 1.19. Mecanisme biochimice care duc la creşterea aterogenicităţii particulelor de LDL. Modificată după Steinberg şi colab. (48 b). Glicozilarea LDL la bolnavi cu diabet zaharat constituie un mecanism particular de creştere a aterogenităţii acestor particule.

Un alt mecanism de prevenire a supraîncărcării cu esteri de colesterol a peretelui vascular este reprezentat de transportul în sens invers — de la țesuturi la ficat — al colesterolului. De fapt esterii de colesterol din LDL înglobați în macrofage sînt hidrolizați sub acțiunea unei lipaze acide (colesterolesterhidrolaza acidă) din lizozomi, iar colesterolul eliberat trece prin membrana lizozomală în citoplasmă, spre membrana externă a celulei. În cazul prezenței, în mediul extracelular, a unor cantități adecvate de HDL, aceste particule lipoproteice preiau colesterolul din membrana celulelor și previn supraîncărcarea. „Excreția" de colesterol de către macrofage este însoțită de sinteza și secreția de apoproteină E care se fixează împreună cu colesterolul pe HDL (5). Dacă acest mecanism este deficitar sau dacă înglobarea de colesterol a fost excesivă în interiorul celulei ca urmare a captării unor cantități prea mari de LDL, colesterolul este reesterificat sub acțiunea acil-CoA-colesterol aciltransferazei (ACAT). Se ajunge astfel la supraîncărcarea cu esteri de colesterol a citoplasmei macrofagelor care devin celule spumoase, blocate în peretele vascular. O parte a acestor celule se lizează eliberînd hidrolaze lizozomale și radicali superoxizi cu efecte toxice asupra celulelor din vecinătate (celule musculare netede și celule endoteliale).

I.6.2. PROLIFERAREA CELULELOR MUSCULARE NETEDE

Acest proces contribuie în mod esențial la îngroșarea plăcii ateromatoase și implicit la îngustarea lumenului vascular. S-a putut demonstra recent că proliferarea celulelor musculare netede este declanșată sub acțiunea unor așa-numiți „factori de creștere" sau „factori mitogeni". Inițial, astfel de factori au fost identificați în plăcuțele sanguine, de unde și denumirea de PDGF (platelet derived growth factor). Ulterior, s-a putut însă demonstra că toate cele patru tipuri de celule implicate în aterogeneză (endoteliale, plăcuțe, celule musculare netede și monocite/macrofage) pot sintetiza și elibera substanțe chemotactice și factori de creștere similari cu PDGF (43). Celulele musculare proliferate dobîndesc proprietăți similare macrofagelor, înglobînd LDL și proprietăți secretorii producînd fibre de colagen și proteoglicani (mucopolizaharide) care realizează o capsulă fibroasă ce include un material cremos gălbui alcătuit din detritusuri celulare și lipide extracelulare. Ulcerarea acestei plăci, respectiv perforarea capsulei fibroase, face ca terciul menționat mai sus să vină în contact cu lumenul vascular, și deci cu elementele sîngelui circulant, determinînd complicații trombotice (51).

I.6.3. FORMAREA DE TROMBI MURALI

Din punct de vedere prognostic, tromboza constituie cel mai important element în evoluția naturală a plăcii ateromatoase. Pe de o parte, tromboza ocluzivă a unui vas determină complicațiile clinice majore ale aterosclerozei, pe de altă parte încorporarea trombilor parietali contribuie într-o măsură importantă la creșterea progresivă a plăcii aterosclerotice

şi la accentuarea caracterului oclusiv (51). Fără îndoială că regimul modificat al circulaţiei, datorat prezenţei plăcii aterosclerotice, şi eventuala ulcerare a acesteia joacă un rol important în determinarea proceselor trombotice. La mecanismele, ţinînd de modificarea peretelui arterial, se adaugă leziunile endoteliale (chiar dacă neevidenţiate morfologic) şi marea bogăţie de tromboplastină tisulară a zonelor din imediata vecinătate a leziunilor aterosclerotice. Alături de factorii locali menţionaţi, aterosclerоticii prezintă însă şi modificări ale hemostazei care predispun la formarea de trombi şi care pot fi, cel puţin în parte, explicate prin perturbările metabolismului lipidic. Aşa, de exemplu, creşterea reactivităţii plăcuţelor la bolnavii cu hipercolesterolemie familială a fost pusă în legătură nu numai cu regimul de curgere a sîngelui printr-un sistem vascular cu numeroase zone de leziune dar şi cu o creştere a colesterolului în membrana plachetară (11). Se ştie, de asemenea, că subiecţii cu hiperlipemie combinată familială (hiperlipemie tip II-b şi IV), la care accelerarea sintezei de VLDL se însoţeşte de un nivel plasmatic crescut al unor enzime de secreţie hepatică, prezintă totodată o creştere a concentraţiei plasmatice a unor factori cu rol în hemostază, cum sînt factorii complexului protrombinei (mai ales factorul VII), factorul XIII stabilizator al fibrinei şi fibronectina, precum şi inhibitorii activării plasminogenului. Se poate deci presupune că formarea de trombi murali este favorizată la astfel de bolnavi şi că un tromb, mai bogat în fibronectină şi factor XIII, va fi mai rezistent la fibrinoliză şi mai rapid încorporat în straturile subendoteliale ale peretelui vascular. Reamintim că sub acţiunea factorului XIII se încorporează inhibitori ai fibrinolizei în reţeaua de fibrină şi se stabilesc legături covalente între monomerii de fibrină şi fibronectină iar prin intermediul acesteia cu fibrele de colagen (15).

I.6.4. ROLUL PROCESELOR IMUNE

Pe baza celor descrise, leziunile aterosclerotice pot fi considerate ca o formă particulară de răspuns inflamator cu caracter de apărare care nu s-a stins ci a progresat spre un proces patologic. Posibilitatea intervenţiei unor mecanisme imune în iniţierea leziunilor endoteliale a fost sesizată de multă vreme pornindu-se de la observaţii anatomoclinice şi experimentale. S-a arătat astfel că leziunile aterosclerotice sînt deosebit de exprimate şi de precoce la bolnavii cu lupoeritematoviscerită sau la cei care fac o reacţie de respingere a grefei, iar, pe de altă parte, injecţiile repetate cu proteine străine, asociate unei diete bogate în lipide, duc la o accelerare a procesului de aterogeneză la animalele de experienţă (33).

Cercetări recente au evidenţiat prezenţa unei forme activate a complementului, aşa-zisul complex de atac al membranei (C_{5b-9}) la suprafaţa celulelor lezate din placa ateromatoasă (44), precum şi a unei infiltrări de limfocite T cu rol de modulare a proliferărilor celulare şi care lipsesc total în artera umană normală (26). Este de aşteptat ca progresul imunologiei să se repercute şi în sensul unei mai bune înţelegeri a mecanismelor care iniţază şi mai ales a celor care perpetuează procesul de aterogeneză.

Subliniem însă că noile achiziţii privind rolul proliferării celulelor musculare netede, al proceselor imune şi al formării de trombi murali nu au diminuat importanţa deosebită a anomaliilor de metabolism lipidic pentru patogeneza aterosclerozei, iar sarcina viitoarelor generaţii de cercetători este de a integra aceste cunoştinţe noi în teoria metabolică.

I.6.5. LEZAREA ENDOTELIILOR

Datele experimentale au demonstrat că deendotelizarea repetată a unei artere cu ajutorul unui cateter prevăzut cu un balon gonflabil este urmată de dezvoltarea unor plăci ateromatoase în zonele lezate. Pe baza acestor observaţii s-a elaborat o concepţie conform căreia factori nocivi (mecanici, chimici, virali, imunologici) ar produce leziuni necrozante ale endoteliilor cu denudarea intimei, avînd drept urmare o aderare a plăcuţelor sanguine la straturile subendoteliale. Plăcuţele aderate ar elibera factori mitogeni (PDGF) care determină proliferarea celulelor musculare netede şi implicit secreţia de către acestea a diferitelor componente ale ţesutului conjunctiv (colagen, elastină, proteoglicani).

Cercetări mai recente au arătat însă că denudarea endoteliană nu este o trăsătură constantă sau precoce în ateroscleroza cauzată de hipercolesterolemie şi că aderarea plăcuţelor nu este nici necesară şi nici suficientă pentru producerea leziunilor aterosclerotice. De fapt PDGF este produs nu numai de către plăcuţe dar şi de către endotelii şi de către monocite/macrofage.

Pe de altă parte, ca urmare a unor studii detaliate asupra endoteliilor, noţiunea de leziune endotelială s-a modificat în mare măsură. Se ştie astăzi că răspunsul endoteliilor la o varietate de stimuli nu implică neapărat un proces de necroză şi denudare ci se traduce prin modificări mai subtile ale funcţiei (disfuncţie endotelială) sau prin inducerea de noi proprietăţi ale endoteliului. Aşa de exemplu, diversele citokine, cum ar fi interleukina-1 (IL1), produse de monocite/macrofage, induc modificări funcţionale proinflamatorii şi protrombotice ale endoteliilor. De fapt, sub influenţa unor astfel de stimuli, endoteliile elaborează proteine care favorizează aderarea leucocitelor la peretele vascular, expun la suprafaţa lor tromboplastină tisulară cu rol procoagulant şi îşi reduc activitatea profibrinolitică. S-ar părea deci că starea funcţională a endoteliilor este tot atît de importantă ca şi integritatea lor anatomică.

Din cele expuse reiese cu prisosinţă natura complexă a biochimiei aterosclerozei. Deşi diverşi autori insistă asupra primordialităţii unui anumit mecanism patogenic sau a unei secvenţe necesare a evenimentelor în aterogeneză, tendinţa actuală este de a se considera ateroscleroza ca fiind un răspuns al peretelui vascular la o varietate de agenţi iniţiatori şi că o multiplicitate de mecanisme contribuie la formarea plăcilor aterosclerotice (36b).

Reproducem în fig. 1.20 o schemă a acestor mecanisme pe baza datelor actuale din literatură.

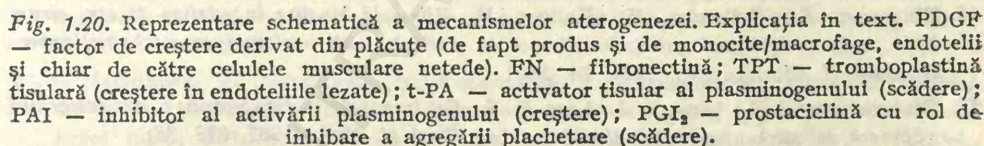


Fig. 1.20. Reprezentare schematică a mecanismelor aterogenezei. Explicaţia în text. PDGF — factor de creştere derivat din plăcuţe (de fapt produs şi de monocite/macrofage, endotelii şi chiar de către celulele musculare netede). FN — fibronectină; TPT — tromboplastină tisulară (creştere în endoteliile lezate); t-PA — activator tisular al plasminogenului (scădere); PAI — inhibitor al activării plasminogenului (creştere); PGI_2 — prostaciclină cu rol de inhibare a agregării plachetare (scădere).

BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

1. Achenbach, H., Kühn, J. H., Lössner, J., Seim, H., *Klinische Anwendung des Carnitins unter besonderer Berücksichtigung des Carnitinmangelsyndrome*, Wiss. Z. Karl—Marx Univ. Leipzig, Math-Naturwiss., R 1985, 34, 3, 259—272.
2. Beaumont, J. L., Carlson, L. A., Cooper, G. R., Fejfar, I. Frederickson, D. S., Strasser, T., *Classification of hyperlipidemias and hyperlipoproteinemias*, Bull. W. Hlth. Org., 1970, 43, 891.
3. Blackburn, H., *Determinants of individual and population blood lipoprotein levels, Genetic factors in nutrition*, Acad. Press. Inc., 1984, 105—136.

4. Bonchek, L. I., Boerboom, L. E., Olinger, G. N., Pepper, J. R., Munns, J., Hutchinson, L., Kissebach, A. H., *Prevention of lipid accumulation in experimental vein bypass by antiplatelet therapy*, Circulation, 1982, 66, 338.
5. Brown, M. S., Goldstein, J. L., *Lipoprotein metabolism in the macrophage: Implications for cholesterol deposition in atherosclerosis*, Ann. Rev. Biochem., 1983, 52, 22–261.
6. Breckenridge, W. C., Little, J. A., Steiner, G., Chow, A., Poapst, M., *Hypertriglyceridemia associated with a deficiency of apolipoprotein* C–II, New Engl. J. Med., 1978, 228, 1265–1270.
7. Carlson, L. A., Holmquist, L., *Concentration of apolipoproteins B, C–I, C–II, C–III and E in sera from normal men and their relation to lipoprotein levels*, Clin. Chim. Acta, 1982, 124, 163.
8. Carlson, L. A., Boberg, I., Hogsted; B., *Some physiological and clinical implications of lipid mobilization from adipose tissue*, Handbook of Physiology, Sect. 5 (Adipose Tissue), Amer. J. Physiol. Soc. (Washington), 1963, 62, 625.
9. Chait, A., *Secondary hyperlipidemia*, J. Clin. Path., 1973, 26 Suppl. 5. 68.
10. Clitherow, J. W., Mitchard, M. ,Harper, N. I., *The possible biological function of pseudocholinesterase*, Nature, 1963, 199, 1060.
11. Colman, R. W., *Platelet function in hyperbetalipoproteinemia*, Thrombos. Haemostas., 1978, 39, 284–303.
12. Cortese, C., Lewis, B., Miller, N. E., Peyman, M. A., Rao, S. N., Slavin, B., Sule, U., Turner, P. R., Uterman, G., Wing, A. J., Weight, M., Wooton, R., *Myelomatosis with type III hyperlipoproteinemia*, New Engl. J. Med., 1982, 307, 79–83.
13. Cucuianu, M., Zdrenghea, D., Pop, M., Opincaru, A., *Increased serum gamma-glutamyltransferase in hypertriglyceridemia: comparison with serum pseudocholinesterase*, Clin. Chim. Acta., 1976, 71, 419–427.
14. Cucuianu, M., Opincaru, A., Tăpălagă, D., *Similar behaviour of lecithin: cholesterol acyltransferaze and pseudocholinesterase in liver disease and hyperlipoproteinemia*, Clin. Chim. Acta, 1978, 85, 73–79.
15. Cucuianu, M., *Biochimia clinică a hemostazei*, Editura Dacia, Cluj-Napoca, 1983, 320–327.
16. Einarsson, K., Hellström, K., Kallver, M., *Bile acid kinetics in relation to sex, serum lipid, body weight and gallblader disease in patients with various types of hyperlipoproteinemia*, J. Clin. Invest., 1974, 54, 1301.
17. Fredericksou, D. S., Levy, R. I., Lees, R. S., *Fat transport in lipoproteins: an integrated approach to mechanisms and disorders*, New Engl. J. Med., 1967, 276, 36.
18. Fruchart, J. C., Bertrand, M., Parra, H., Gentilini, J. L., Boniface B., Boniface, M., *Lipoprotéines et apolipoprotéines plasmatiques .Intérêt de leur dosage dans le dépistage de l'athérosclerose coronarienne. Comparaison avec les informations fournies par les coronarographies*, Nouv. Press Méd., 1982, II, 3491–3494.
19. Goldstein, J. L., Brown, M. S., *Familial hypercholesterolemia. A genetic regulatory defect in cholesterol metabolism*, Editorial Amer. J. Med., 1975, 58, 147.
20. Goldstein, J. L., Kitta, T., Brown, M. S., *Defective lipoprotein receptors and atherosclerosis*, New Engl. J. Med., 1983, 30, 288.
21. Goldstein, J. L., Brown, M. S., *Progress in understanding the LDL-receptor and HMG-CoA reductase, the membrane proteins that regulate plasma cholesterol*, J. Lipid. Red., 1984, 25, 1450.
22. Gresham, G. A., Howard, A. N., McQueen, J. M., Bowyer, D. E., *Atherosclerosis in primates*, Brit. J. Exptl. Pathol., 1965, 46, 94.

22. b. Gwynne, I.T., Schwartz, C. I., (Guest Editors): A symposium: *Hypercholesterolemia and the probucol experience*, Amer. J. Cardiol., 1988, 62, N. 3 (incluzînd o serie de articole, pp. 1–81 B).

23. Haller, H., Leonhardt, W., Hanefeld, M., Schultze J., Fritz, Th., *Bedeutung und Therapie des Risikcofactors Hyperlipoproteinämie*, in: Haller, H., Hanefe.ld, M., Jaross, M., *Symposium über Lipidstoffwechselerkrankungen*, Dresden, 1973, 264.

24. Havel, R. J., *Role of the liver in atherosclerosis*, Arteriosclerosis, 1985, 5, 569–580.

25. Herbert, P. M., Assman, G., Gotto, A. M., Frederickson, D. S., *Familial lipoprotein deficiency: abetalipoproteinemia, hypobetalipoproteinemia an Tangier disease*, in, Stanbury, Wyngaarden, Frederickson, Brown, *The metabolic basis of inherited disease*, McGraw-Hill, New York, 1982, 589–651.

25. b. Horák, I., Cuparencu, B., Cucuianu, M., Opincaru, A., Seuşan, E., Vincze, I., *Effects of some benzodiazepine derivates on triton WR–1339-induced hyperlipidaemia in rats*, Atherosclerosis, 1976, 24, 81–97.

26. Jonasson, L., Holm, J., Skalli, O., Bondjers, G., Hansson, G. R., *Regional accumulation of T-cells, macrophages and smooth muscle cells in the human atherosclerotic plaque*, Arteriosclerosis, 1986, 6, 131.

27. Kannel, W. B., Dawber, T. R., Friedman, G. D., Glennon, W. E., McNamara, P. M., *Risc factors in coronary heart disease. An evaluation of several serum lipids as predictors of coronary heart disease*, The Framingham Study. Ann. Intern. Med., 1964, 61, 888.

28. Kissebach, A. H., Alfarsi, S., Adams, P. W., Seed, M., Folkard, J., Wynn, V., *Transport kinetics of plasma free-fatty acids, VLDL-triglycerides and apoproteins in patients with endogenous hypertriglyceridemia*, Atherosclerosis, 1976, 24, 199.

29. Lamb, R. J., Fallon, H. J., *An enzymatic explanation for dietary induced alternations in hepatic glycerolipid metabolism*, Biochim, Biophys. Acta, 1974, 348, 179–188.

30. Lehtonen, A., Marniemi, J., Inberg, M., Maatela, J., Alanen, E., Niitimäky, O., *Levels of serum lipids, apolipoproteins A-I and B and pseudocholinesterase activity and their discriminative values in patiens with coronary by-pass operations*, Atherosclerosis, 1986, 59, 215–221.

31. Mabuchi, H., Sakay, T., Sakay, Y., Yoshimura, A., Watanabe, A., Wakasugi, T., Koizumi, J., Takeda, R., *Reduction of serum cholesterol in heterozygous patients with familial hypercholesterolemia. Additive effects of compactin and cholestyramine*, New Eng. J. Med., 1983, 308, 609–613.

31. b. Matzuzawa, Y., Yamashita, S., Funahaschi, T., Yamamoto, A., Tarui, S., *Selective seduction of cholesterol in HDL-2 fraction by probucol in familial hypercholesterolemia and hyper HDL_2 cholesterolemia with abnormal cholesteryl ester transfer*, Amer. J. Cardiol., 1988, 62, 66B–72 B.

32. Mayes, P., *Metabolism of lipids*, in Harper, H. A., *Review of Physiological Chemistry*, 14^{th} Ed. Lange Med. Publ., Los Altos, California, 1973, 268–310.

33. Minick, C. R., Alonso, D. R., Rankin, L., *Role of immunologic arterial injury in atherogenesis*, Thromb. Haemostas., 1978, 39, 304–311.

34. Moga, A., Hărăguş, S., *Ateroscleroza*, Ed. Acad. R.P.R., Bucureşti, 1963.

35. Moga, A., Cucuianu, M., Orha, I., Vlaicu, R., *Hipertensiunea arterială şi ateroscleroza*, Ed. Medicală, Bucureşti, 1970.

36. Morel, D. W., Hessler, J. R., Chisholm, G. M., *Low density lipoprotein cytotoxicity induced by free radical peroxidation of lipid*, J. Lipid. Res., 1983, 24, 1070–1074.

36. b. Munro, I. M., Cotran, R. S., *Biology of Disease: The pathogenesis of atherosclerosis: atherosclerosis and inflamation*, 1988, 249–281.

37. Myant, N. B., *Cholesterol metabolism*, J. Clin. Pathol., 1973, 24, 1–4.

38. Nikkilä, E. A., *Metabolism of plasma triglycerides in endogenous hypertriglyceridemia*, in, Greten, Levine, Pfeiffer, Renold, *Lipid metabolism, Obesity and Diabetes Mellitus: Impact upon atherosclerosis*, Ed. G. Thieme, Stuttgart, 1974, 29–34.
39. Norum, K. P., Gjone, E., *Familial plasma lecithin: cholesterol acyltransferase deficiency. Biochemical study of a new inborn error of metabolism*, Scand. J. Clin. Lab. Invest., 1967, 20, 231.
40. Norum, P. A., Lakier, J. B., Goldstein, S., Angel, A., Goldberg, R. B., Black, W. D., Noffze, D. K., Dolphin, P. J., Edelglass, J., Bogorad, D. D., Alaupovic, P., *Familial deficiency of apolipoprotein A-I and C-III and precocious coronary artery disease*, New Engl. J. Med., 1982, 306, 1513–1514.
40. b. Rath, N., Niedorf, A., Weber, W., Bergman, I., Beisiegel, U., *Lipoprotein (a) an atherogenic particle with homology to plasminogen*, 6th Dresden Lipid Symposium, Dresden 17–19 Oct. 1988, Abstract p. 136.
41. Rifkind, B. M., *The Lipid Research Clinics coronary prevention trial*, Drugs, 31, suppl. I., 1986, 53–60.
42. Robinson, D. S., *Plasma triglyceride metabolism*, J. Clin. Path., 1973, 26. suppl. 5.5.
43. Ross, R., *The patogenesis of atherosclerosis, an update*, New Engl. J. Med., 1986, 314, 488–500.
44. Rus, H. G., Niculescu, F., Constantinescu, E., Cristea, A., Vlaicu, R., *Immunoelectron microscopic localization of the terminal* C_{5b-9} *complement complex in human atherosclerotic fibrous plaque*, Atherosclerosis, 1986, 61, 35–42.
45. Schaefer, E. J., Levy, R. I., *Pathogenesis and management of lipoprotein disoders*, New Engl. J. Med., 1985, 312, 1300.
46. Simionescu, N., Vasile, E., Lupu, F., Popescu, E., Simionescu, M., *Prelesional liposomes in the arterial intima and cardiac valves of the hyperlipoproteinemic rabbits*, Amer. J. Pathol., 1986, 123, 109.
47. Simons, L. A., *Interrelations of lipids and lipoproteins with coronary heart disease mortality in 19 countries*, Am. J. Cardiol. 1986, 57, 5G-10G.
48. Stamler, J., *Review of primary prevention trials of coronary heart disease*, Acta Med. Scand., 1985, suppl. 701, 100–128.
48. b. Steinberg, D., Parthasarathy, S., Carew, T. E., Khoo, I. C., Witzum, I. L., *Beyond cholesterol in Modification of low density lipoprotein that increase its atherogenicity*, New Engl. J. Med., 1989, 320, 915–924.
49. Velican, C., Velican, D., *Etiopatogenia aterosclerozei*, Ed. Medicală, Bucureşti, 1981.
50. Walker, W. J., *Changing US life style and declining vascular mortality — a retrospective, Editorial*, New Engl. J. Med., 1983, 308, 649–651.
51. Woolf, N., *Pathology of atherosclerosis*, in Miller, N. E., *Atherosclerosis and approaches to therapy*, Raven Press, New York, 1983, 1–27.
52. Young, S. G., Hubl, S. T., Chappel, O. A., Schmidt, R. S., Claiborne, F., Snyder, S. M., Terdiman, J. F., *Familial hypobetalipoproteinemia associated with a mutant species of apolipoprotein B(B 46)*, New Engl. J. Med. 1989. 320, 1064–1610.

II. PROTEINELE PLASMATICE

Proteinele plasmatice reprezintă un constituent principal al plasmei, alcătuind aproximativ 75% din reziduul uscat al plasmei (7g proteine din 9 g reziduu uscat).

În ultimele decenii și mai ales în ultimii ani, s-au realizat mari progrese pe calea identificării și separării diverselor componente din plasmă. De fapt, la ora actuală, metoda electroforetică de separare în cinci fracțiuni a proteinelor plasmatice este depășită de tehnicile imunochimice prin care se pot evalua cu mare precizie cele peste 90 de componente proteice ale plasmei. Aceste posibilități au deschis noi perspective, nu numai pentru o mai bună cunoaștere a semnificației funcționale a diverselor proteine plasmatice, dar și pentru diagnosticul clinic. În cele ce urmează sînt prezentate cîteva noțiuni privind proprietățile fundamentale ale proteinelor, care să faciliteze înțelegerea noilor metode de separare și purificare. Se discută cîteva proteine plasmatice cu importanță funcțională și cu rol în diagnosticul de laborator și sînt prezentate aplicațiile clinice ale acestor investigații. Capitolul nu abordează proteinele plasmatice cu rol în coagulare și fibrinoliză, care formează obiectul unui domeniu special al biochimiei hemostazei (20).

II.1. GENERALITĂȚI PRIVIND PROTEINELE PLASMATICE

I.1.1. STRUCTURA ȘI MECANISMELE DE SINTEZĂ

Proteinele sînt constituite din unul sau mai multe lanțuri polipeptidice, fiecare fiind constituit din mai mulți α-aminoacizi, legați covalent prin legături peptidice. Greutatea moleculară a proteinelor variază între aproximativ 500 și mai multe milioane daltoni (D = greutatea atomului de hidrogen = $1{,}67 \times 10^{-24}$g). Indiferent de funcția sau specia de origine, toate proteinele sînt alcătuite dintr-un set de 20 aminoacizi esențiali, aranjați în variate secvențe specifice. În funcție de compoziția lor, se clasifică în două mari clase: simple și conjugate (21, 82). Proteinele simple sînt cele alcătuite numai din lanțuri de aminoacizi, din a căror hidroliză rezultă numai acești aminoacizi, fără alte grupări organice sau anorganice. Proteinele conjugate sînt acele proteine care, în urma hidrolizei, eliberează nu numai aminoacizi ci și grupări organice sau anorga-

nice, denumite grupări prostetice. Proteinele conjugate pot fi clasificate, pe baza naturii grupului lor prostetic, în nucleoproteine, fosfoproteine, metaloproteine, glicoproteine și lipoproteine. În stare naturală, molecula proteinelor are o formă tridimensională denumită conformație, în funcție de care se disting proteine fibrilare și proteine globulare. Proteinele fibrilare constau din lanțuri polipeptice dispuse în paralel, de-a lungul unui singur ax. Sînt fizic stabile și insolubile în apă sau soluții diluate. Alcătuiesc elementele structurale de bază ale țesuturilor de susținere ale organismului (spre exemplu, colagenul, elastina, cheratina). În proteinele globulare, lanțurile polipeptidice sînt împachetate strîns în forme moleculare sferice sau globulare. Majoritatea sînt solubile în soluții apoase. Au multiple funcții mobile și dinamice în celule (cele peste 2000 de enzime diferite descrise pînă astăzi sînt proteine globulare). Funcțional, ele intră în diferite clase: enzime, hormoni, proteine imunoefectoare, proteine de transport, proteine contractile, proteine de fază acută etc.

Structura primară a unei proteine se referă la structura secvenței de aminoacizi a lanțurilor polipeptidice din componență. Structura secundară se referă la extinderea sau aranjarea unui lanț polipetidic pe o singură axă (longitudinal, în cazul proteinelor fibrilare). Structura terțiară presupune împachetarea lanțului polipeptidic tridimensional, pentru a alcătui o formă spațială globulară. Structura cuaternară se referă la modul în care se organizează spațial proteinele oligomere care conțin unul sau mai multe lanțuri polipeptidice.

Proteinele sînt denaturate, structural și funcțional, la valori extreme de pH, temperatură sau agenți chimici sau biologici. Uneori, îndeosebi cînd legăturile peptidice (covalente) nu sînt alterate, denaturarea poate fi reversibilă, restabilindu-se structura terțiară și cuaternară pe baza unor legături ionice (de hidrogen, forțe van de Waals) sau punți disulfidice. Structura și funcția proteinelor este reflectată de secvența de aminoacizi din componența lanțurilor polipeptidice, existînd o foarte strînsă relație între codificarea genetică și funcția biologică a proteinelor.

Informația genetică este codificată în succesiunea nucleotidelor din molecula de acid dezoxiribonucleic (ADN), macromoleculele esențiale din structura cromozomului. Segmentul de ADN responsabil de sinteza completă a unui lanț polipeptidic se numește genă sau cistron. Fiecare aminoacid este codificat de trei nucleotide succesive din structura ADN, denumite triplet de codificare. Genele normale rămîn în cromozom, neservind direct ca matriță de sinteză a proteinelor pe ribozomi. Mesajul genetic este transcris cu nucleotide complementare în structura acidului ribonucleic (mRNA), ale cărui triplete de codificare, denumite codoni, sînt complementare celor din molecula de ADN. mRNA, ajuns la nivelul ribozomilor, în citoplasmă, servește ca matriță de asamblare a lanțului polipeptidic. Gena operatoare controlează intensitatea sintezei, exercitînd un control asupra genelor structurale. Una sau mai multe gene structurale, împreună cu gena lor operatoare, alcătuiesc structura genetică denumită operon. Operonul se află sub controlul genei reglatoare, responsabilă de sinteza unor macromolecule proteice denumite represori. Gena operatoare, combinată cu un represor, este inactivă („reprimată"). Atunci cînd sistemul represor a fost inactivat, operonul se „determină", fiind astfel inițiată sinteza proteinelor corespunzătoare.

II.1.2. METODE DE SEPARARE A PROTEINELOR

Izolarea în stare pură și analiza proteinelor din punct de vedere structural și funcțional nu ar fi fost posibilă fără dezvoltarea unor tehnici de mare sensibilitate și acuratețe, bazate pe proprietățile fizico-chimice ale proteinelor. Majoritatea datelor pe care le avem asupra structurii și funcțiilor biologice ale proteinelor sînt direct legate de permanenta perfecționare a tehnicilor de studiu. Tehnicile care permit separarea și analiza proteinelor se bazează pe mărimea moleculei, solubilitate, diferență în adsorbție, afinitate biologică pentru alte molecule sau încărcare electrică.

Proteinele globulare în soluție pot fi cu ușurință separate de molecule cu greutate moleculară mică prin dializă, utilizînd membrane semipermeabile, care rețin macromoleculele, moleculele mici trecînd prin membrană în mediul de dializă. Ultrafiltrarea permite separarea proteinelor prin trecerea soluției, sub influența presiunii sau forței centrifuge, printr-un filtru cu proprietăți semipermeabile care reține macromoleculele.

II.1.2.1. CENTRIFUGAREA ÎN GRADIENT, GELFILTRAREA, CROMATOGRAFIA

Centrifugarea în gradient de densitate sau centrifugarea zonală este o metodă de separare nu numai a proteinelor ci și a organitelor celulare sau a altor structuri macromoleculare. Tehnica constă în crearea în tubul de centrifugă a unui gradient al concentrației de sucroză de la 20% sus la 60% jos, la baza tubului, în care mixtura de proteine, sub influența forței centrifuge, se repartizează în benzi, după greutatea, densitatea, forma macromoleculelor.

Gelfiltrarea este o metodă simplă și foarte utilă în separarea proteinelor, constînd în trecerea pe o coloană cu bile fine de dextrani (Sephadex) a mixturii proteice; proteinele cu greutate moleculară mică trec prin porii bilelor, în timp ce proteinele cu greutate moleculară mare rămîn în volumul de excludere și înaintează mai rapid pe coloană.

Cromatografia pe schimbători de ioni utilizează bile de dextran sau celuloză, de care sînt atașate grupări cu sarcini pozitive de suprafață (dietilaminoetil; DEAE) sau grupări cu sarcini negative (carboximetil; CM), la aceste sarcini atașîndu-se proteinele potrivit încărcării lor electrice, la pH neutru, urmînd ca desorbția lor din coloană să se facă gradat, în gradient de pH sau molaritate.

Cromatografia de afinitate se bazează pe capacitatea biologică a unei proteine de a se lega necovalent cu altă moleculă denumită ligand, care este legată, la rîndul ei, covalent la o matrice solidă (agaroză, silicageli, dextrani, poliacrilamidă). După atașarea specifică a proteinei, din mixtură, la ligand (atașare de tip enzimă-substrat sau imunoglobulină-proteină antigen), desorbția proteinei fixate se obține cu eluenți specifici (glicozizi, agenți chaotropici) sau metode de eluție nespecifice (pH scăzut, concentrații crescute de săruri).

O serie de metode de purificare și analiză a proteinelor se bazează pe proprietatea acestora de a migra în cîmp electric (tehnici electroforetice).

Menţionăm că prin obţinerea în stare cît mai pură a diverselor proteine se poate ajunge ca, prin injectarea lor la alte specii (iepure, capră, porc etc.), să fie obţinute antiseruri specifice utilizabile în laboratoarele de imunochimie. Aceste antiseruri conţin imunoglobuline specifice sintetizate în urma proliferării policlonale a plasmocitelor animalului imunizat cu proteina specifică. În ultimul timp, se utilizează tot mai mult imunoglobuline cu înaltă specificitate sintetizate *in vitro* — anticorpi monoclonali — rezultate ca urmare a proliferării monoclonale a unui singur tip de celule. Hibridomul (celula producătoare) este obţinut în urma fuziunii, *in vitro* a unor limfocite splenice de şoarece, anterior imunizat cu antigenul specific, cu celule mielomatoase de şoarece care au proprietatea de a sintetiza imunoglobuline monoclonale.

II. 1.2.2. ELECTROFOREZA PROTEINELOR

Electroforeza este mişcarea particulelor încărcate electric într-un solvent cînd acesta este plasat într-un cîmp electric. Este o metodă foarte eficientă pentru separarea macromoleculelor, pentru caracterizarea componentelor unei mixturi sau pentru a izola macromoleculele dintr-o mixtură, putînd fi deci folosită ca o metodă analitică sau preparativă. În electroforeza zonală, o cantitate mică de soluţie este plasată într-un mediu-suport (hîrtie de filtru, agar, agaroză, acetat de celuloză etc.). Atunci cînd se aplică un potenţial electric tamponului, macromoleculele din soluţie migrează. Rata de migrare este determinată de energia cîmpului electric, de rezistenţa mediului de suport şi de încărcarea netă a unei macromolecule la un voltaj dat; cu cît încărcarea netă este mai mare, cu atît şi viteza de migrare este mai mare. În laboratorul clinic, electroforeza zonală se utilizează curent pentru a separa componentele serului, ale lichidului cefalorahidian, ale urinii sau a altor fluide biologice. La electroforeza serului se obţin 5 benzi majore. Prima bandă (fracţiune), cea mai anodică, este albumina, următoarea reprezentată de α 1-globuline, conţine: α-1-antitripsina, α-1-lipoproteina şi α-1-acid glicoproteina; a treia bandă α-2-globulinele cuprinde haptoglobina, cerutoplasmina, α_2 macroglobulina şi alte globuline (vezi tabelul 2.1b), a patra bandă, β-globulinele, cuprinde β-lipoproteinele, transferina plasminogenul, com-

Tabelul 2.1 a

Valori procentuale şi în g/dl ale fracţiunilor proteinelor serice separate prin electroforeză pe hîrtie

Fracţiunea	Valori procentuale	Valori în g/dl
Albumine	50–59	3,5–5,5
Globuline α1	3–5	0,25–0,35
Globuline α2	7–9	0,5–0,75
Globuline β	11–14	0,8–1,05
Globuline γ	16–20	1,1–1,5
Total	100	6,5–7,5

ponentele de complement, hemopexina; gamaglobulinele constituie cea de-a cincea bandă, fiind alcătuită din imunoglobulinele IgG, IgA, IgM, IgD și IgE. Totuși unele imunoglobuline au și migrare în regiunea beta-gama și beta iar IgG se poate extinde pînă în regiunea α_2. De aceea, IgG monoclonală poate fi identificată din regiunea α_2 pînă în γ. Valorile fracțiunilor proteinelor serice separate prin electroforeză pe hîrtie de filtru sînt redate în Tabelul 2.1. Modificarea raportului dintre diferitele fracțiuni proteice separate prin electroforeză poartă numele de

Tabelul 2.1 b

PRINCIPALELE PROTEINE PLASMATICE

MIGRAREA ELECTROFORETICĂ	*PROTEINĂ*	*CONCENTRAȚIA PLASMATICĂ* mg/dl
PREALBUMINĂ	PREALBUMINĂ	25
ALBUMINĂ	ALBUMINĂ	4000
ALFA-1	Alfa-1-antitripsina	280
	Apolipoproteina A	200
	Alfa-1-glicoproteina acidă	90
	Componentul C9 al sistemului complement	8
	Protrombina	5
	Alfa-1-microglobulina	5
	Factorul IX al coagulării	1
	Factorul X al coagulării	1
	Transcobalamina I	0,3
INTER-ALFA	Proteina S/Vitronectina	50
ALFA-2	Haptoglobina	300
	Alfa-2-macroglobulina	290
	Alfa-2-glicoproteina acidă	60
	Ceruloplasmina	35
	Antitrombina III	30
	Cl inhibitorul	24
	Kininogenul	10
	Alfa-2-plasmin inhibitorul	6
	Proteina de legare a retinolului	4
	Proteine de legare a tiroxinei	2
BETA	Transferina	260
	Apolipoproteina B*	100
	Componentul C3 al sistemului complement	80
	Hemopexina	75
	Componentul C4 al sistemului complement	40
	Fibronectina	33
	Plasminogenul	20
	Factorul B al sistemului complement	8
	Factorul XIII al coagulării	3
	Factorul V al coagulării	2
	Factorul VIII al coagulării	1
	Beta-2-microglobulina	0,1
GAMA	IgG	1200
	IgA	200
	IgM	150
	IgD	10
	IgE	1
	Componentul Clq al sistemului complement	15
	Prekalikreina	1
	Proteina C-reactivă	0,5

* Apo B proaspăt secretată de către hepatocite sub formă de VLDL migrează cu $\alpha 2$.

disproteinemii. Determinarea prin electroforeză a proteinelor serice tebuie completată prin determinări cantitative ale proteinelor individuale. Cele mai accesibile metode în acest sens sînt metodele imunologice.

II. 1.2.3. METODELE IMUNOLOGICE

Imunoelectroforeza a fost prima metodă utilizată pentru identificarea și determinarea proteinelor plasmatice. Într-o primă etapă acestea sînt separate pe baza încărcăturii lor electrice prin migrare în gel (agar, agaroză); într-o a doua etapă, proteinele migrate sînt precipitate cu antiseruri specifice (poli- sau monospecifice) care se introduc în șanțuri săpate în gel paralel cu direcția de migrare. Proteinele, ca urmare a difuziei în gel, precipită cu antiserul specific. „Arcul de precipitare obținut este determinat de mobilitatea electroforetică a proteinei, concentrația serică, caracteristicile difuziei și puterea precipitantă a antiserului utilizat (figura 2.1.). Inițial, pe baza acestei metode, se făceau aprecieri semicantitative ale proteinelor individuale din plasmă. Astăzi este utilizată doar în diagnosticul gamopatiilor monoclonale, determinările cantitative prin alte tehnici imunochimice fiind mult mai utile. Identificarea imunoglobulinelor monoclonale prin imunoelectroforeză are unele limitări, ea putînd să nu identifice o proteină monoclonală atunci cînd este în cantitate mică; de asemenea este dificil de identificat lanțul ușor al IgM monoclonală, necesitînd reducerea acesteia sau precipitarea euglobulinelor. O metodă ce poate fi folosită în paralel cu imunoelectroforeza, la identificarea imunoglobulinelor monoclonale, este imunofixarea. Aceasta constă în acoperirea gelului, în care au migrat proteinele, cu antiserul specific și evidențierea acestora prin zonele de imunoprecipitare obținute.

Imunodifuzia radială permite determinarea cantitativă a proteinelor atunci cînd se stabilește o relație între concentrația antigenului și diametrul inelului de precipitare obținut la difuzia antigenului într-un gel care conține anticorpi specifici. Mancini și colaboratorii au demonstrat, în 1965, relația liniară existentă între concentrația antigenului și pătratul diametrului inelului de precipitare. Astfel, pentru determinarea unei proteine se adaugă volume egale de ser de referință și probe de testat în godeuri efectuate într-un gel de agaroză conținînd un antiser monospecific corespunzător. Imunodifuzia radială este simplă, ușor de executat dar necesită un timp destul de îndelungat pentru efectuare și este dificil de utilizat pentru determinarea antigenelor cu greutate moleculară mare (figura 2.2).

Electroimunodifuzia, tehnică introdusă de Laurell în 1966, constă în difuzarea în cîmp electric a antigenului (proteina) într-un gel care conține înglobat anticorpul specific. Se obțin astfel zone de precipitare (rachete sau conuri) a căror înălțime sau suprafață este direct proporțională cu concentrația antigenului. (figura 2.3.). Migrarea se face 18 h, obținîndu-se rezultate mai rapid decît prin imunodifuzia radială, tehnica avînd totodată și o mai mare sensibilitate.

Nefelometria este o metodă rapidă de determinare cantitativă a proteinelor din ser sau alte lichide biologice. Nefelometrele măsoară turbiditatea unei soluţii. În soluţii diluate, reacţia dintre antigene şi anticorpi duce la o turbiditate crescută care poate fi măsurată prin dispersarea unei surse de lumină incidentă. Determinarea prin nefelometrie a unor proteine se face prin adăugarea de cantităţi constante de anticorp specific înalt purificat şi optic clar, la cantităţi variate de antigen. Adăugarea de polietilenglicol intensifică precipitarea complexelor imune, citirea turbidităţii făcîndu-se cu un fascicul laser de heliu-neon; rezultatele se raportează la o curbă standard realizată cu un ser de referinţă.

Tehnicile imunoenzimatice, introduse în 1971 de Engvall şi Perlmann, prin simplitatea lor şi prin faptul că nu necesită un echipament sofisticat, sînt tot mai utilizate în laboratorul clinic. Principiul tehnicii ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) constă în legarea, prin adsorbţie, la suprafaţă de plastic (polistiren) a unuia din reactivi (antigene sau anticorpi specifici, poli- sau monoclonali) şi cuplarea cu o enzimă a celui de-al doilea reactiv (în general un anticorp; enzima fiind reprezentată de peroxidază sau fosfatază alcalină), în aşa fel încît să nu fie modificată nici reactivitatea anticorpului nici activitatea enzimei. Vizualizarea reacţiei se face utilizînd cromogeni specifici enzimei (spre exemplu, ortofenilendiamina pentru peroxidază). Citirea rezultatelor se face spectrofotometric (figura 2.4.). Aceste tehnici permit determinarea unor proteine pînă la concentraţii de ng/ml, înlocuind cu succes tehnicile radioimunologice.

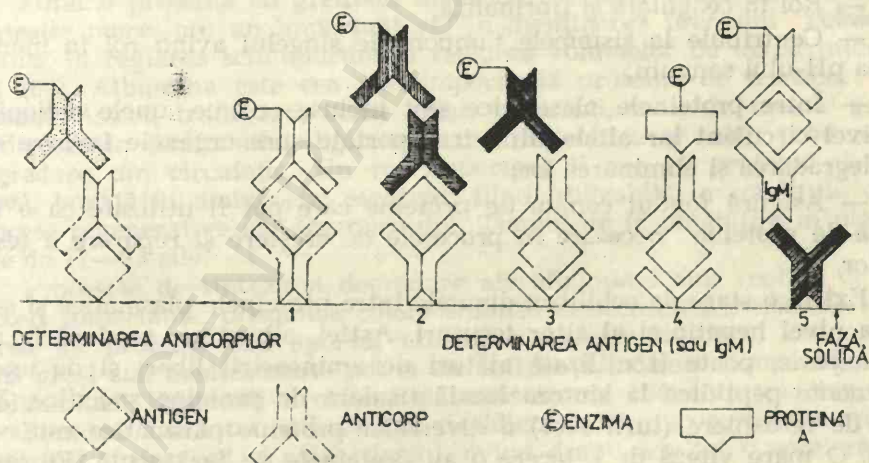


Fig. 2.4. Tipuri de ELISA utilizate în imunodiagnostic. Pentru determinarea anticorpilor, antigenul este legat la faza solidă. Pentru determinarea antigenelor se utilizează metoda „sandwich" directă (1), „sandwich" indirectă (2) (anticorpii haşuraţi în schemă arată specii de origine diferită) sau se pot imobiliza la faza solidă fragmente $F(ab)_2$ astfel încît anticorpul marcat va recunoaşte fragmentul Fc al celui de-al doilea anticorp (3). Utilizarea conjugatelor enzimă-proteina A (a Stafilococului aureu) ca şi agent universal de detectare este foarte utilă (4). În cadrul tehnicii de captură (5), macromoleculele de detectat sînt în al doilea strat, legarea fiind realizată printr-un IgM specific.

II.1.3. LOCUL DE PRODUCERE ȘI FUNCȚIILE PROTEINELOR PLASMATICE

Cea mai mare parte a proteinelor plasmatice se sintetizează în ficat iar imunoglobulinele în celulele imunocompetente (plasmocite). Alături de cele două surse principale de producere a proteinelor plasmatice mai există și alte surse care sînt implicate în acest proces. Astfel, o parte a lipoproteinelor este sintetizată chiar la nivelul mucoasei intestinale iar sinteza hepatică a glicoproteinelor se consideră a se efectua pe seama unor precursori proteoglicanici (mucopolizaharidici), eliberați din depolimerizarea substanței fundamentale a țesutului conjunctiv. Totodată, macrofagele contribuie la producerea unor proteine plasmatice sintetizînd componente ale complementului și inhibitori proteolitici, iar endoteliile vasculare produc activatori ai fibrinolizei, factor von Willebrand, fibronectină.

Proteinele plasmatice îndeplinesc importante funcții în organism, care pot fi sintetizate astfel:

— Menținerea presiunii coloidosmotice a plasmei, contribuind la schimburile efectuate de lichidul extracelular (albumina asigură 80% din presiunea coloidosmotică plasmatică);

— Rol în medierea răspunsului imunologic;

— Rol de transport al vitaminelor, hormonilor, ionilor metalici, lipidelor, medicamentelor și a unor metaboliți;

— Rol în coagulare și fibrinoliză;

— Contribuie la sistemele tampon ale sîngelui avînd rol în menținerea pH-ului sanguin;

— Între proteinele plasmatice sînt incluse enzime, unele acționînd la nivel circulant iar altele fiind transportate spre organele în care are loc degradarea și eliminarea lor;

— Asigură fondul comun de proteine care pot fi utilizate ca o rezervă de proteine necesare în procesele de creștere și reparare a țesuturilor.

Există o stare de echilibru dinamic între proteinele plasmatice și cele de la nivel hepatic și al altor țesuturi. Astfel, albumina, produsă la nivel hepatic, poate fi utilizată alături de aminoacizii liberi și de unele fragmente peptidice la sinteza locală tisulară de proteine specifice. Viteza de remaniere (turn-over) a diverselor proteine plasmatice este variată. O mare viteză de refacere o au proteinele de fază acută. Fibrinogenul se reface cu o viteză de 50 mg/dl plasmă/h; imunoglobulinele și albumina au o durată de viață mai lungă și un turn-over mai lent. Proteinele plasmatice pot trece prin transcitoză la nivelul celulelor endoteliale capilare, ajungînd în spațiile interstițiale, de unde sînt apoi drenate pe cale limfatică în circulație (83).

În continuare, sînt descrise proprietățile, funcțiile și modificările patologice ale principalelor proteine plasmatice.

II.2. PRINCIPALELE PROTEINE PLASMATICE. BIOCHIMIE ȘI FIZIOPATOLOGIE

II.2.1. ALBUMINA

Albumina este proteina serică cu cea mai mare concentrație. Are greutate moleculară de 66000 D și o concentrație serică de 4,4 g/dl. Molecula constă dintr-un singur lanț polipeptidic, structura globulară fiind menținută de 17 legături disulfidice, dînd moleculei o formă elipsoidală, iar 50% din configurația cuaternară a polipeptidului este de tip alfa-helix (50).

Este sintetizată la nivelul hepatocitelor, viteza de sinteză fiind mult mai mare decît a altor proteine, durînd aproximativ 30 minute de la început pînă la punerea în circulație. Producția hepatică de albumină este relativ constantă 20 g/zi), putînd însă fi rapid dublată sau triplată. Cu toate acestea un ficat normal are depozite de albumină mai mici de 1 g (87). Albumina este prezentă în toate lichidele biologice și în spațiul intercelular. Întregul rezervor de albumină al organismului este de aproximativ 300 g, repartizate astfel: 120 g intravascular iar 180 g în spațiul extravascular, fiind concentrată în cantitate mare în spațiul intercelular din piele, mușchi și tractul gastrointestinal.

Este degradată în special la nivelul tractului gastrointestinal unde, în contact cu sucurile digestive, este proteolizată de enzimele activate în cursul digestiei; 10—15% este metabolizată și intrahepatic.

Fiind o proteină cu greutate moleculară relativ mică, dar cu concentrație mare, are un important rol în menținerea presiunii coloidosmotice, în reglarea schimburilor și reglarea volumelor de lichid interstițial (82). Albumina este cea mai importantă proteină de transport din plasmă. Astfel, transportă acizii grași, hormonii, ionii de metale grele, medicamente (sulfamide, digitalice etc.), bilirubina și alți produși de degradare din circulație. Un rol important îl are ca proteină de rezervă, bogată în aminoacizi esențiali, fiind utilizabilă în condițiile unor procese regenerative ale organismului. Timpul de înjumătățire în plasmă este de 17—23 zile.

Procesele de sinteză și degradare ale albuminei sînt reglate de doi factori importanți: presiunea coloidosmotică și secreția hormonală. Pierderea de proteine sau aportul alimentar excesiv de ioni, aminoacizi, acizi grași sau medicamente pot și ele influența indirect sinteza hepatică a albuminei. Hormonii tiroidieni și testosteronul induc sinteza hepatică de albumină. De notat că hormonii tiroidieni ca și glucocorticoizii stimulează atît sinteza cît și catabolismul, avînd drept rezultat o accelerare a procesului de turn-over (82).

Analiza patogenetică a modificării concentrației serice a albuminei presupune urmărirea sintezei și degradării acesteia precum și pierderea sau degradarea ei în cursul unor procese patologice. Dacă hiperalbuminemia nu are o semnificație deosebită din punct de vedere practic, apărînd doar în marile sindroame de deshidratare sau asociată unor fenomene de regenerare hepatică, hipoalbuminemia are multiple semnificații, putînd fi asociată unor variate game de procese patologice. Hipoalbuminemia

cu cauză în sinteza hepatică apare relativ tîrziu în afectarea și destrucția parenchimului hepatic datorită marii rezerve a capacității hepatice de sinteză proteică. Malnutriția, cu scăderea marcată a aportului în aminoacizi esențiali, este o altă cauză a hipoalbuminemiei de sinteză. Pierderea albuminei la nivel renal (sindromul nefrotic) sau gastrointestinal (gastroenteropatii exudative), cu depășirea capacității de sinteză hepatică, sînt principalele cauze de hipoalbuminemie prin consum la care se poate adăuga consumul din infecțiile cronice exudative, marile traumatisme, arsuri și unele afecțiuni dermatologice. Privitor la valoarea diagnostică a concentrației serice a albuminei, valori sub 3 g/dl sînt sugestive pentru un proces patologic iar valori sub 1,5 g/dl sînt semnificative pentru progresiunea și prognosticul rezervat al afecțiunii (87).

Analbuminemia este o boală genetică transmisă autosomal recesiv apărînd la homozigoții născuți îndeosebi din părinți consanguini. Constă în absența albuminei la electroforeză; clinic este rar simptomatică, uneori prezentînd edeme sau steatoree și constant hipotensiune. Examenele de laborator evidențiază un VSH accelerat și teste de disproteinemie pozitive, în condițiile unor probe funcționale hepatice normale. Nivelele altor proteine serice cu sinteză hepatică sînt mult crescute, ca expresie a unei hipersinteze compensatorii, lucru probat la perfuzarea cu soluție de albumină umană care are ca efect normalizarea vitezei de sinteză a celorlalte proteine serice (21). De notat că, în astfel de cazuri, T/2 al albuminei în plasmă este mult prelungit, ajungînd la 55 zile.

II.2.2. INHIBITORII PLASMATICI AI PROTEAZELOR (SERPINE)

Sîngele conține o serie de sisteme enzimatice proteolitice, care se activează ca răspuns la diverse agresiuni, dar ale căror efecte sînt menținute sub control prin cel puțin trei mecanisme:

a. Proteazele cu rol în coagulare, fibrinoliză, kininoformare sau avînd activitate de tip complement se găsesc de regulă în plasmă sub formă inactivă de proenzime (zimogeni), activîndu-se doar în mod tranzitoriu, printr-un proces de proteoliză limitată care, prin îndepărtarea unui peptid de clivare, expune centrul activ al enzimei.

b. O bună parte a proteazelor activate este rapid îndepărtată din plasmă prin captare și degradare în ficat.

c. Activitatea enzimelor proteolitice din circulație este limitată de prezența unor proteine plasmatice cu rol inhibitor.

Întrucît acest ultim mecanism pare a fi esențial pentru prevenirea unei proteolize patologice, prezentăm în cele ce urmează principalele aspecte biochimice și de patologie, privind inhibitorii proteazelor, denumite recent și serpine (serpine protease inhibitors) datorită faptului că au structuri moleculare și mecanisme de acțiune similare (tabelul 2.2., 7, 20, 22, 56).

Inhibitorii proteazelor alcătuiesc aproximativ 20% din globulinele plasmei și migrează electroforetic mai ales cu $\alpha 1$ și α_2 globulinele (1, 2). Perfecționarea tehnicilor de separare a proteazelor și a diverșilor inhibitori au permis o bună diferențiere a acestora din urmă în funcție de proprietățile lor fizico-chimice și de reactivitatea lor particulară în procesul

Tabelul 2.2

Principalele caracteristici ale serpinelor (serine protease inhibitors)

Proteina	Migrare electroforetică	Greutate moleculară	Concentrație plasmatică mg/dl	Funcții	Modificări în stări patologice	
					Creșteri	Scăderi
α1-antitripsina	α_1	54000	200–400	Inhibitor proteazic al elastazei, colagenazei, tripsinei, kalicreinei, chimotripsinei, plasminei, elastazei	Reacții de fază acută, tumori, graviditate	Deficit genetic
α1-antichimotripsina	α_1	68000	30–60	Inhibitor al proteazelor pancreatice, mastocitare, chimotripsinei, catepsinei D leucocitare, elastazei	Procese inflamatorii, tumori	
Inhibitorul proteinei C	α	57000	0,3–0,6	Inhibitor al proteinei C activate, trombinei, factorul X, activatorul tisular al plasminogenului		Deficit genetic combinat de factori V/VIII, CIVD
Antitrombina III	Inter α	65000	20–40	Inhibitorul trombinei FXa, FXIIa, FXIa, FXIa kalicreinei, plasminei, tripsinei	HLP IIb, IV	Ciroze, tromboze venoase, CIVD tromboembolism ereditar
C1-inhibitor	α_2	104000	15–35	Inhibitor al C1r, Cls, FIXa, FXIIa, plasminei, kalicreinei	Hemodializă cronică	Limfoame, deficit ereditar
α_2-inhibitorul plasminei	α_2	70000	6	Inhibitor al plasminei, FXIa, FXa, FIXa, kalicreinei, trombinei	Postoperator, infarct miocardic acut	Insuficiență hepatică severă, CIVD, terapie fibrinolitică, leucemii acute, deficit genetic
Inhibitorul activatorului plasminogenului		50000	10–30 ng/ml	activatorul plasminogenului; — de tip tisular — de tip urinar	— postoperator — tromboze venoase profunde — infarct miocardic acut — HLP IIb, IV	

CIVD – coagulare intravasculară diseminată
HLP – hiperlipoproteinemii

Tabelul 2.3

Situsul de reacție al unor serpine

Serpine	Situs de reacție	Acționează asupra
α_1 antitripsina	Pro *Met* Ser Ile	Elastaza
Antitrombină III	Gly *Arg* Ser Leu	Thrombina
Cl inhibitor	Ala *Arg* Thr Leu	Cls, Kalikreina
Mutanta Pittsburg	Pro *Arg* Ser Ile	Thrombina, Kalikreină
Mutanta Valină	Pro *Val* Ser Ile	Elastază

de inhibare a unor anumite enzime proteolitice. Se distinge astfel α 1-antitripsina (α 1-AT), antitrombina III (ATIII), α 2-inhibitorul plasminei (α_2PI), inhibitorul componentului C1 al sistemului complement (C1 INH), precum și recent descoperiții și mai puțin bine definiții inhibitori ai activatorilor plasminogenului și ai proteinei C (1, 33). Redăm în tabelul 2.2. cîteva din caracteristicile principalilor inhibitori ai proteinelor. Specificitatea inhibitorilor menționați este destul de relativă, o anumită antiprotează putînd inhiba, într-o oarecare măsură, mai multe enzime proteolitice. Așa de exemplu, plasmina este inhibată nu numai de α_2PI dar și de către α_1 AT și α_2M. Pe de altă parte α_2PI, care reprezintă doar aproximativ 1/45 din numărul total de inhibitori, inhibă extrem de rapid plasmina, dovedindu-se, sub acest aspect, mult mai eficace decît α_1AT care, deși se găsește în plasmă în concentrații mult mai ridicate (vezi tabelul 2.2.), inhibă lent plasmina dovedind însă o predilecție în procesul de inhibare a elastazei. La rîndul său, trombina, o protează serinică, poate fi inhibată nu numai de către ATIII dar și de către α_1AT și α_2M; ATIII exercită însă un efect inhibitor mai rapid și este singura antiprotează care își amplifică mult efectul în prezența heparinei. Afinitatea inhibitorilor pentru o anumită enzimă proteolitică se explică, cel puțin în parte, pe baza unei anumite secvențe a aminoacizilor din structura lor care corespund oarecum cu cea a substratului preferat al proteazei. Așa cum, spre exemplu, trombina clivează de preferință legăturile peptidice ale argininei din molecula de fibrinogen, în timp ce metionina reprezintă zona de clivare preferată de elastază, iar mutația care a dus la substituirea prin arginină a metioninei din poziția 358 a moleculei de α_1AT a făcut ca această antiprotează să nu mai inhibe elastaza și să dobîndească proprietăți de ATIII, cu alte cuvinte, mutația Pittsburg: 358 Met → Arg a făcut ca α_1AT să blocheze trombina (63).

Procesul de inhibare decurge, de regulă, prin formarea unor complexe ireversibile inhibitor enzimă care blochează centrul activ al proteazei. Excepție face, în acest sens, α_2M care leagă proteazele fără a le masca centrul activ și fără a le inactiva în totalitate. Oricum complexele proteaze-inhibitor sînt apoi rapid îndepărtate din plasmă (53). De notat că diversele antiproteaze nu reacționează cu zimogenii enzimelor proteolitice, iar activarea acestora prin proteoliză limitată creează totodată premisele pentru blocarea, de către inhibitori, a proteazei astfel rezultate.

În cele ce urmează sînt prezentate cîteva aspecte biochimice și de patologie a principalilor inhibitori plasmatici ai proteazelor.

II.2.2.1. ALFA-1-ANTITRIPSINA

Este principalul inhibitor al enzimelor proteolitice, găsite în plasmă, responsabil de peste 90% din capacitatea totală inhibitorie a enzimelor proteolitice. Inhibă activitatea proteolitică a tripsinei, chimotripsinei, elastazei, kalicreinei, colagenozei, plasminei, trombinei, factorilor XI și X ai coagulării, reninei ca și a unor elastaze leucocitare (42). În condiții fiziologice, inhibă elastaza leucocitară, de aceea se mai numește și alfa-1 inhibitorul proteazelor ($\alpha_1 P_i$).

Peste 40% din proteină este prezentă în plasmă, restul de 60% fiind în spațiile extravasculare, inclusiv în secreții și lichide biologice; lichid amniotic, lichid pleural, lichid cefalorahidian, salivă, colostru, lichid seminal, lichid sinovial, mucus cervical, suc duodenal, bilă, meconiu. A fost de asemenea evidențiată în plăcuțele sanguine, macrofagele alveolare, neutrofile, limfocite și mastocite (9).

Locul principal de sinteză a α_1AT este ficatul, macrofagele putînd și ele contribui la această sinteză. În orice caz, există dovezi după care macrofagele ar elabora o substanță care stimulează sinteza de α_1AT și de ATIII în hepatocite (42). Se găsește în plasmă, în concentrații de 200—400 mg/dl și are un timp de înjumătățire, în circulație, de 6—7 zile. Este o glicoproteină cu migrare electroforetică în α, compusă dintr-un singur lanț polipeptidic a 394 aminoacizi și trei lanțuri de carbohidrați. Are o greutate moleculară de 54.000 D și încărcare electrică de suprafață negativă. Situsul activ al moleculei este centrat pe metionina din poziția 358, între ultimii 36 aminoacizi ai capătului C-terminal al moleculei (7).

Specificitatea de inhibiție a fiecărei serpine este substanțial dacă nu complet dependentă de aminoacidul din centrul activ. Astfel, înlocuirea metioninei din centrul activ cu arginina duce la schimbarea funcției întregii molecule care nu mai inhibă elastaza, dar inhibă trombina ca și antitrombina III (aceasta are arginina în centrul activ) (tabelul 2.3). Acțiunea inhibitorie antiproteazică se face prin interacțiunea uzuală între o enzimă și substrat. α_1AT acționează ca un substrat competitiv pentru enzime, acestea clivînd un fragment de 4000—8000 greutate moleculară (11). Odată atașată la enzimă, α_1AT formează un complex foarte stabil care nu mai permite enzimei să interacționeze cu alte substrate. Este o proteină de fază acută prezentînd valori crescute în condițiile unui proces inflamator acut sau cronic. Spectrul larg de enzime proteolitice pe care le inhibă nu este depășit decît de α_2M care inhibă orice tip de enzimă proteolitică, indiferent de clasă.

Asocierea deficitului de α1-antitripsină cu emfizemul precoce a dus la concluzia că dereglarea echilibrului proteaze-antiproteaze este foarte importantă pentru realizarea bronhopneumopatiei cronice obstructive. Astfel, afectarea plămînului poate rezulta fie datorită unei expuneri prelungite la proteazele leucocitare, ca în cazul inflamației cronice, fie datorită unei insuficiențe a inhibitorilor corespunzători, ca în cazul deficitului de α_1AT.

În afara acestor doi factori, balanța mai este modificată și de alți factori;

— Fumatul, care intervine inactivînd α_1AT, prin oxidarea ei de către radicali din tutun;

— Neutrofilele stimulate pot inactiva α_1AT prin intermediul radicalilor liberi de oxigen eliberaţi.

Aceste două condiţii acţionează în special local, ducînd la modificări mici care, acumulîndu-se de-a lungul anilor, realizează afectarea cronică a plămînilor.

Genetică

α_1AT este codificată de o pereche de alele codominante care influenţează multe din proprietăţile ei, inclusiv nivelul plasmatic, modul de răspuns în cadrul reacţiei de fază acută, compoziţia în aminoacizi şi mobilitatea electroforetică.

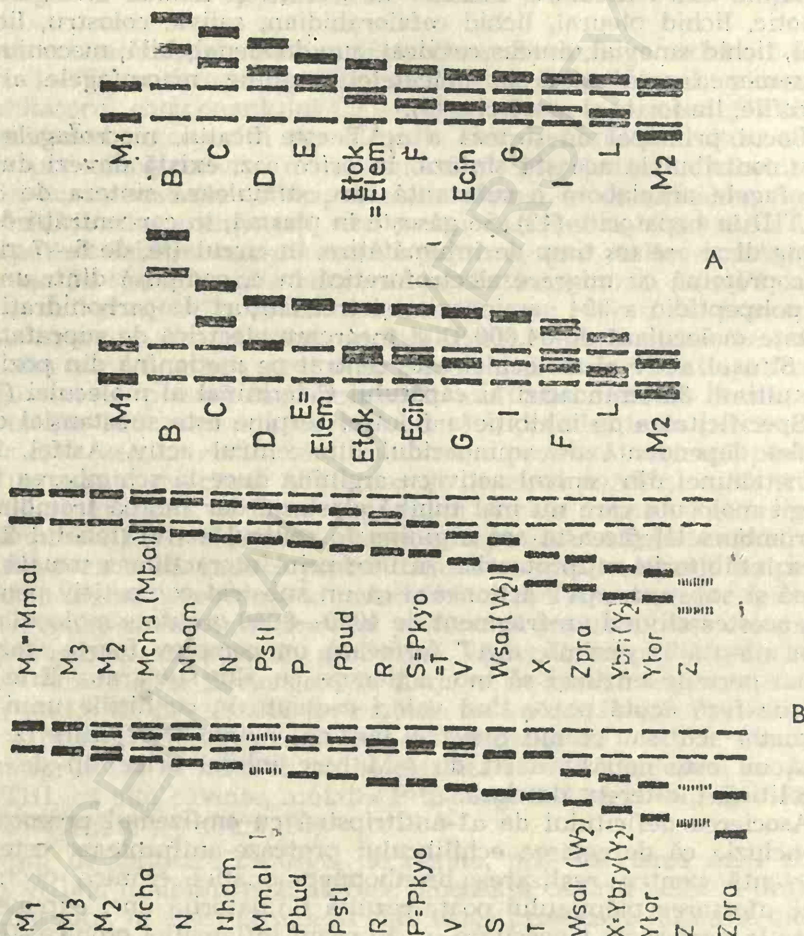


*Fig. 2.5.*A. Variante ale sistemului Pi, anodale faţă de M, prezentînd două benzi majore pentru fiecare variantă. Sus, electroforeza în gel de amidon; jos, izoelectrofocusare în gel de poliacrilamidă. Benzile înguste indică poziţia variantei M1. B. Variantele sistemului Pi, la catod faţă de M, prezentînd două benzi majore pentru fiecare variantă. Sus, electroforeza în gel de amidon; jos, izoelectrofocusare în gel de poliacrilamidă. la un gradient de pH de 4-5. Benzile înguste indică poziţia variantei M1 (după Cox şi colab. (15). Separarea în peste 50 subfracţiuni (alele) are importanţă doar pentru studii de genetică şi medicină legală.

Utilizînd diverse tehnici electroforetice (în amidon, poliacrilamidă) au fost observate variante genetice de α_1AT incluse în așa-numitul sistem Pi (proteinase inhibitor), sistem care desemnează și include polimorfismul genetic al α_1AT (17). Au fost recunoscute și comunicate peste 50 de alele electroforetice de α_1AT, inclusiv alele nule a căror nomenclatură a fost standardizată pe plan internațional (17) (figura 2.5). Benzile de migrare electroforetică au fost notate cu litere mari, PIB fiind cea mai anodică, PiM varianta cu migrare medie iar PiZ cea cu migrarea cea mai apropiată de catod (figura 2.5).

Pentru studiul clinic, cele mai importante variante genetice sînt cele asociate cu nivele plasmatice scăzute ale α_1AT, cele mai comune fiind alelele S și Z. Acestea sînt prezente în aproximativ 10% din populația Europei, Americii de Nord și Australiei. Varianta genotipică PiM este cea mai comună genă alelă la toate grupurile etnice populaționale, fiind caracterizată prin nivele serice de 200—400 mg/dl. Variantele fenotipice PiMS, PiMZ și PiZZ sînt asociate cu valori reduse la 79, 57 și respectiv 12% față de nivelul plasmatic normal al α_1AT. Chiar dacă determinarea nivelului plasmatic nu oferă informații despre tipul electroforetic, permite totuși recunoașterea deficitelor severe, de tipul PiZZ (42).

Variantele S și Z de α_1AT sînt similare celor M (normale), avînd aceeași capacitate inhibitorie, compoziție în carbohidrați și timp de înjumătățire în circulație. Totuși nivelele scăzute, care sînt întîlnite în aceste variante genetice, sînt cauzate de o mutație în variantele S și Z, și anume în varianta S, în poziția 264 acidul glutamic este substituit cu valina și, în varianta Z, în poziția 342 acidul glutamic cu lizina. Acidul glutamic din pozițiile amintite are rolul de a stabiliza molecula. Această reducere a stabilizării moleculei este mai accentuată în varianta S și contribuie la un nivel seric scăzut datorită degradării proteolitice a proteinei. Mutația din varianta S se asociază cu o modificare la nivelul genei și o oarecare reducere de ARN mesager.

În deficitul Z, 15% din polipeptidul Z este normal, în timp ce 85% din el este blocat în căile de producție endoplasmică a hepatocitului înainte de procesarea finală a lanțurilor de carbohidrați, defectul afectînd procesul de transport. Acest defect duce la apariția de agregate de α_1 antitripsina Z, vizibile microscopic, mai evidente în zonele periportale cu sinteză activă (colorație PAS).

Există descris și un fenotip Pi-nul, în care defectul genetic este la nivelul codificării sintezei de ARNm, proteina nefiind deloc sintetizată la nivel hepatocitar (31).

Deficitul de α 1 antitripsină și bolile pulmonare

În Europa și SUA, aproximativ 2% din cazurile de emfizem pulmonar sînt asociate cu deficit homozigot de α_1AT (fenotipurile PiZZ și Pi-nul). Emfizemul este o afecțiune cronică constînd în lărgirea spațiilor de schimb gazos la nivel pulmonar, dincolo de bronșiola terminală, lărgire rezultată din distrucția pereților alveolari (emfizem panacinar). Persoanele cu nivele serice ale α_1AT sub 35% din valoarea normală au o cantitate de inhibitor proteolitic insuficientă pentru a proteja parenchimul pulmonar de acțiunea elastazei granulocitare care astfel distruge matricea de țesut. Se produc astfel modificări la nivelul celulei, care duc la moartea celulei, cu apariția necrozei. În aceste cazuri, administrarea de plasmă sau α_1AT purificată nu pare să aibă efecte favorabile. Doar transplantul hepatic poate ameliora prognosticul.

Deficitul de α 1 antitripsină și alte boli

La 4,5% din pacienții cu deficit de α_1AT de tipul PiZZ a fost notată apariția poliartritei reumatoide. Totuși asocierea acestui deficit cu lupusul eritematos sistemic sau cu alte colagenoze pare a fi întîmplătoare (9). Uveita anterioară, afecțiune oculară comună și importantă, mediată imunologic, a fost asociată cu fenotipul PiMS și PiMZ de deficit al α_1AT. Unele fenotipuri pot fi asociate cu afecțiuni dermatologice; urticarie cronică, dermatita de contact sau psoriazis. Fenotipul PiMZ a fost asociat și cu boli renale, îndeosebi glomerulonefrita membranoproliferativă. Deficitul de α_1AT (mai ales fenotipurile MZ și ZZ) se asociază uneori cu afecțiuni hepatice survenite atît în vîrsta copilăriei cît și la adult, fără a se putea însă face o legătură certă cu prezența de incluziuni de α_1AT (PAS pozitive) în hepatocite (vezi pag. 99).

Scăderi ale nivelului circulant al α_1AT la pacienți fără deficit genetic pot fi doar rareori întîlnite în condiții patologice excepționale, care implică un consum mare al inhibitorilor proteolitici, ca de exemplu în marile traumatisme, în septicemii, în coagulare intravasculară diseminată, sindromul de insuficiență respiratorie acută, în cursul hemodializei cronice sau în gamopatiile monoclonale, cînd uneori imunoglobulina monoclonală se poate lega cu α_1AT într-un complex.

Sindromul de șoc septic și α 1-antitripsina

Sindromul de șoc septic poate fi privit ca o formă fulminantă de distrucție tisulară indusă de neutrofil. Ea apare atunci cînd se produce o activare extinsă a neutrofilelor ca în septicemie, endotoxinemie, precum și atunci cînd se produce o sechestrare a neutrofilelor, ca în bypassul cardiopulmonar. Activarea masivă a neutrofilelor are drept efect eliberarea unor cantități mari de elastază, care duce la inactivarea serpinelor plasmatice. Aceste modificări au stimulat studii pentru realizarea unor antitripsine prin inginerie genetică care au, în centrul activ, în loc de metionină arginină (α_1AT Pittsburgh recombinantă). Această mutație transformă proteina dintr-un inhibitor al elastazei într-un foarte puternic inhibitor al coagulării, incluzînd trombina, kalikreina, factorul XI și factorul XIIa. În condiții experimentale, la animale cu septicemie, hipotensiune, coagulare intravasculară diseminată, administrarea de α_1AT recombinantă duce la o atenuare a scăderii antitrombinei III, factorului XI, fibrinogenului și la o prelungire a supraviețuirii. Și alte mutante prin ingineria genetică sînt în studiu, de exemplu prin înlocuirea metioninei din centrul activ cu valina. Astfel de mutante ar putea fi utilizate profilactic în prevenirea apariției șocului prin complexarea elastazei, în condițiile în care α_1AT normală este oxidativ inactivată (11, 13).

Creșteri ale nivelului seric al α1AT se întîlnesc frecvent în condițiile unor reacții de fază acută, fiind considerată o importantă proteină din grupul celor „de fază acută", a căror sinteză este mult accelerată în condițile unei inflamații acute sau cronice cu leziune și distrucție tisulară. Astfel, observațiile clinice și experimentale raportează nivele serice crescute în infecții cronice și acute respiratorii, virale sau bacteriene, intervenții chirurgicale, infarct miocardic acut, hepatită virală acută și hepatite cronice. Date recente sugerează un rol de imunomodulator pe care α1AT îl are prin acțiune asupra limfocitului T helper și supresor (9).

II.2.2.2. ALFA-2-MACROGLOBULINA

Este o glicoproteină cu greutate moleculară de 725.000 D. (19S) care domină cantitativ fracţiunea electroforetică α_2. Are o structură dimerică, cu două lanţuri polipeptidice, legate prin punţi disulfidice. Prin tratare cu uree se desface în două macromolecule. În funcţie de conţinutul glicoproteinei în acid sialic, manoză şi galactoză au fost caracterizate prin izoelectrofocusare mai multe variante moleculare (3); α_2 macroglobulina (α_2M) nu face parte din superfamilia serpine.

Principala funcţie a acestei glicoproteine este de a inhiba o mare varietate de enzime de tipul carboxil-, tiol-, serin-, metal-, proteaze, dintre care cele mai importante sînt enzime ale coagulării (plasmina, trombina, kalicreina), proteaze neutre, elastaze, colagenaze de origine leucocitară şi catepsina G. Interacţiunea inhibitorului (1 moleculă) cu 2 molecule de enzimă are ca rezultat clivarea unui fragment cu greutate moleculară de 85.000 D. Cele două situsuri active ale inhibitorului constau din cîte un tiolester format între glutamină şi cisteină. Enzimele complexate cu α_2M îşi pierd activitatea proteolitică dar îşi păstrează activitatea esterazică sau amidolitică (67). Trombina complexată cu α_2M îşi păstrează proprietatea de a coagula fibrinogenul iar plasmina complexată cu α_2M îl poate degrada, însă aceste acţiuni au loc foarte lent faţă de activitatea enzimelor libere. Activitatea tripsinei complexată cu α_2M creşte la pH acid sugerînd posibilitatea ca aceste complexe să devină mai active la nivel tisular unde, sub influenţa unui fenomen inflamator, scade pH-ul, accentuîndu-se astfel activitatea enzimatică faţă de macromoleculele degradate. Ca şi în cazul α_1AT, complexele proteinaze-α_2M pot fi detectate în circulaţie, fiind considerate o modalitate de clearence al proteazelor serinice din circulaţie care, astfel complexate, sînt reţinute în sistemul reticulohistiocitar şi degradate. Viteza de înjumătăţire a concentraţiei acestor complexe în circulaţie este de 6—10 minute (3). Locul de sinteză al α_2M este foarte variat, o parte fiind sintetizată la nivel hepatic, o altă parte extrahepatic la nivelul monocitelor, limfocitelor, celulelor endoteliale, fibroblastelor. Probabil aşa se explică faptul că, deşi are greutate moleculară mare, este prezentă şi în alte lichide biologice; lichid sinovial, cefalorahidian, salivă, lacrimi, bilă, exudate şi revărsate seroase. Raportul concentraţiei plasmă/spaţiu intercelular este de 3/1.

Are o concentraţie serică de 200—400 mg/dl, cu o rată de sinteză de 400—700 mg/zi şi o rată zilnică de metabolizare de 6—8%. Timpul de înjumătăţire al concentraţiei din plasmă este de 190—260 ore, α_2M se găseşte la suprafaţa membranei limfocitelor şi are funcţii imunoreglatoare, intervenind în supresia şi depresia sintezei de imunoglobuline. Alături de albumină este implicată în transportul unor ioni, îndeosebi a Zn^{2+}, cu capacitate de legare de 73 μg Zn^{2+}/g α_2M. Totodată contribuie şi la transportul altor microelemente. Este implicată în transportul unor hormoni dintre care cel mai important este insulina. Deficitul genetic total al sintezei de α_2M este incompatibil cu viaţa, iar deficitul parţial, heterozigot, este însoţit de tulburări de coagulare pasagere determinate de o fibrinoliză accentuată (85). Scăderi accentuate ale nivelului seric al α_2M sînt întîlnite în condiţiile de consum exagerat din cadrul pancreatitei acute, a unor septicemii sau a coagulării intravasculare diseminate. Nivele crescute ale α_2M au fost raportate în diabetul zaharat, expresie a

unei sinteze proteice accelerate; în diabetul juvenil, nivelele crescute ale α_2M se corelează cu durata bolii, fiind crescută îndeosebi la cazurile cu retinopatie și nefropatie diabetică (56). În sindroamele nefrotice, au fost notate nivele mult crescute ale α_2M, interpretate ca și creșteri secundare datorate sintezei accelerate impuse de pierderea de proteine la nivel glomerular precum **şi faptul că,** datorită greutății moleculare mari, nu se pierde prin urină decît parțial. Hepatitele acute și cronice au, de asemenea, asociate nivele serice crescute ale α_2M. În procesele inflamatorii acute reumatismale, ca și în reumatismele inflamatorii cronice, datorită permeabilității locale alterate, nivelele de α_2M din lichidul sinovial ajung să egaleze sau să depășească cu 30—40% nivelul seric, inhibitorul complexat cu elastazele și colagenazele avînd un rol patogenetic în inducerea leziunilor locale (6).

II.2.2.3. ALFA-2-INHIBITORUL PLASMINEI (α_2 ANTIPLASMINA, α_2 AP)

Această antiprotează este o glicoproteină care inactivează aproape instantaneu activitatea plasminei formînd cu ea un complex ireversibil care blochează centrul activ al enzimei. S-a putut preciza că mecanismul biochimic al inhibării constă din reacția între gruparea OH din radicalul serină al plasminei și carboxilul unui radical arginină din α_2AP (formarea unei legături ester). Spectrul inhibitor al α_2AP se extinde și asupra altor proteaze cum sînt kalicreina și factorul XIa, dar la concentrații fiziologice de 6 mg/dl această antiprotează nu inhibă în mod apreciabil trombina, factorii Xa, IXa și activitatea esterazică a complementului. Este important de precizat că α_2AP este singurul inhibitor al proteazelor care se fixează de rețeaua de fibrină putînd astfel antagoniza chiar și la acest nivel plasmina formată prin activarea plasminogenului adsorbit pe filamentele de fibrină (79). Se știe astăzi că în cursul coagulării sîngelui, aproximativ 10—20% din α_2AP se fixează în cheag și că acest proces este catalizat de factorul XIII stabilizator al fibrinei. Există, de asemenea, indicii după care α_2AP s-ar sintetiza în hepatocite iar timpul de înjumătățire în plasmă ar fi de 2—3 zile (2).

Nivelul plasmatic al α_2AP scade în insuficiențele hepatice severe, ca urmare a deficitului de sinteză, scăderi ale α_2AP survin și în cursul terapiei fibrinolitice sau în sindroamele de coagulare intravasculară diseminată, datorită formării de complexe între plasmină și α_2AP care sînt apoi îndepărtate din plasmă (7).

O scădere marcată a α_2AP se întîlnește în leucemiile acute, cu promielocite, datorită, se pare, degradării proteolitice a inhibitorului de către proteazele eliberate din leucocite. În această situație particulară, o antiprotează, respectiv α_2AP, care inhibă în mod selectiv plasmina, devine substratul elastazei leucocitare și este degradată de aceeași protează. Creșteri moderate ale nivelului plasmatic al α_2AP se constată în cursul reacțiilor de fază acută (postoperator, infarct miocardic) (1, 22, 33).

O problemă interesantă de patologie este reprezentată de deficitul genetic de α_2AP sau boala Miyasato. Anomalia evoluează cu sindrom hemoragipar în doi timpi datorită lizei precoce a dopului hemostatic deoarece α_2AP este singura antiprotează în măsură să antagonizeze plasmina în interiorul rețelei de fibrină. Pe de altă parte, α_2M și α_1AT care

nu pătrund în rețeaua die fibrină sînt totuși în măsură să prevină o proteoliză sistemică astfel încît boala Miyasato nu se însoțește de o degradare importantă a proteinelor plasmatice sau tisulare (46).

II.2.2.4. ALȚI INHIBITORI AI PROTEAZELOR (INHIBITORII ACTIVATORILOR PLASMINOGENULUI; ANTITROMBINA III)

Degradarea proteolitică a cheagului de fibrină este mediată prin intermediul plasminei formată din plasminogen sub acțiunea proteolitică a activatorilor plasminogenului. Inhibitorii activării plasminogenului se clasifică în 3 grupe: inhibitorul activării de tip endotelial (PAI-1), inhibitorul activării de tip placentar (PAI-2), inhibitorul activării de tip urinar (PAI-3) și proteaza nexina 1.

PAI 1 este sintetizat de celula endotelială, de hapatocite de fibroblastele transformate și de celula musculară netedă. El reacționează atît cu activatorul plasminogenului de tip urinar (u-PA) cît și cu activatorul plasminogenului de tip tisular (t-PA). Nivelul seric al PAI-1, la sănătoși, determinat prin ELISA, este de 10—30 ng/ml. PAI-1 are o durată de viață de cîteva minute, fiind rapid îndepărtat din circulație prin intermediul ficatului. În plasmă el se comportă ca un reactant de fază acută, valori crescute întîlnindu-se postoperator, după traumatisme severe sau infarct miocardic. În aceste cazuri, interleukina 1 și endotoxina favorizează eliberarea lui din endoteliu. Valori crescute apar în pancreatite acute și în caz de tromboze venoase profunde. În cazul cardiopatiei ischemice, nivelul creșterii nu se corelează cu severitatea bolii. Nivele funcționale crescute de PAI-1 se corelează cu supragreutatea, insulinemia precum și cu hiperlipoproteinemia și, în special, cu nivelul trigliceridelor serice. În acest ultim caz, creșterea PAI-1 este determinată de creșterea sintezei la nivelul hepatocitelor. Unul din inductorii cei mai importanți la nivel hepatocitar este insulina. Existența unor nivele circulante crescute de PAI-1 în cardiopatia ischemică și hiperlipoproteinemii pune problema găsirii unor procedee prin care să poată obține scăderi de durată ale PAI-1, avînd drept consecință potențarea trombolizei. Demn de remarcat este faptul că inhibitorul activării plasminogenului este la rîndul său inactivat de o protează serinică dependentă de vitamina K, așa-numita proteină C (diferită de proteina C reactivă), iar forma activată de către trombină a proteinei C este și ea inhibată lent de către o antiprotează încă insuficient caracterizată.

Tot o antiprotează este și antitrombina III al cărei deficit se asociază cu o accentuată predispoziție la tromboză. Nu insistăm asupra acestor aspecte care sînt, în primul rînd, de domeniul hemostazei. Considerăm că cele prezentate sînt în măsură să atragă atenția asupra importanței echilibrului, destul de precar, între proteaze și inhibitorii acestora (23, 34, 35).

II.2.3. MARKERI TUMORALI

Markerii tumorali sînt, în general, definiți ca antigene de suprafață ale celulelor tumorale, apărute în urma transformării neoplazice. Ei pot fi clasificați în:

— *Antigene tumorale specifice,* produse numai de celulele tumorale. Nici un astfel de marker nu a fost identificat încă.

— *Atingene asociate tumorilor,* produse de celulele tumorale, dar și de unele celule normale sau fetale. Utilitatea lor în diagnostic derivă din diferențele cantitative sau modificările biochimice care apar în tumori. Toți markerii tumorali cunoscuți aparțin ultimei categorii.

Primii markeri tumorali utilizați au fost două proteine oncofetale; alfa fetoproteina (AFP) și antigenul carcinoembrionar (ACE), care sînt tratate mai extins în acest capitol. O dată cu introducerea tehnologiei de

Tabelul 2.4

Markeri tumorali

	Determinant antigenic	*Ac utilizați*	*Valori crescute*
CA	19–9 Sialo-lacto-N-fuco pentanoză II	AcM imunizare BALB/c cu linie celulară din cancer colorectal uman	C. pancreatic C. colorectal C. hepatic C. gastric
CA	125 glicoproteină asemănătoare cu mucina 200.000 D GM–200.000	Ac.M imunizare BALB/c cu o linie celulară de carcinom ovarian	C. ovarian epitelial C. hepatic C. tub digestiv
CA	15–3 glicoproteină cu GM mare	Ac. M imunizare cu membrane celulare de carcinom mamar	C. mamar
MCA (mucin like-carcinoma antigen)	glicoproteină 350.000 D	AcM	C. mamar
Tiroglobulina	prohormon în sinteza tiroxinei și triiodotiroinei	AcM	Carcinom tiroidian folicular metastazat în plămîn
Gonadotrofina corionică	hormon glicoproteic secretat de celulele sinciţiale trofoblastice ale placentei	AcM AcP	Coriocarcinoame Mola hidatiformă Teratocarcinom
Gama Seminoproteina	proteină specifică secretată de prostată în lichidul seminal	AcM	C. prostatic
Dimerul D	apare în urma degradării către plasmină a cheagului de fibrină	AcM	C. ovarian (total nespecific)
AFP	proteină oncofetală produsă de ficat	AcM AcP	C. hepatic C. tub digestiv C. pulmonar
ACE	proteină oncofetală produsă de tubul digestiv	AcM AcP	C. tub digestiv C. mamar

C = cancer
AcM = anticorp monoclonal
AcP = anticorp policlonal
BALB/c = linie de șoareci utilizată pentru producerea de anticorpi monoclonali.

producere a anticorpilor monoclonali, prin imunizarea cu linii celulare tumorale, s-au obținut o serie de anticorpi monoclonali cu specificitate pentru antigene asociate tumorilor. Utilizarea anticorpilor monoclonali la realizarea unor truse pentru determinarea cantitativă a acestor antigene tumorale a permis identificarea unor noi markeri tumorali (tabel 2.4).

II.2.3.1. ALFA FETOPROTEINA

Alfa fetoproteina (AFP) este o glicoproteină serică cu migrare electroforetică în regiunea α_1. Are o greutate moleculară de 75.000 de daltoni și aparține grupului de proteine așa-numite „oncofetale" sau „carcinoembrionare", sintetizate de țesuturile embrionare sau placentare ca și de unele tipuri de celule transformate malign. Molecula are în structură un singur lanț polipeptidic și un lanț glucidic (4% din moleculă).

Este sintetizată în ficat în timpul vieții intrauterine și în cantități mici în membranele sacului vitelin și mucoasa gastrointestinală, îndeplinind o funcție fiziologică pentru făt asemănătoare albuminei la adult. Sinteza începe în săptămîna a 4-a a vieții intrauterine (debutul embriogenezei ficatului fetal), ajungînd la concentrația maximă în serul fetal în perioada săptămînilor 10—13 (3000 μg/ml), apoi scăzînd rapid pînă la 200 μg/ml în săptămîna a 32-a (92).

AFP trece în urina fătului și, în consecință, în lichidul amniotic unde ajunge la un raport maxim de la 1 la 200 față de serul fetal în săptămînile 12—14 și scade apoi paralel cu cea din serul fetal. Concentrațiile maxime de AFP în serul matern ajung în săptămînile 28—32 de gestație la aproximativ 500 ng/ml. Serul de cordon ombilical la naștere are valori aproximativ în jur de 70 μg/ml, iar adultul sănătos prezintă valori ale AFP sub 20 ng/ml, uneori chiar sub 5—10 ng/ml (8). Datorită capacității de creștere și regenerare masivă a ficatului copilului din primul an de viață, pot fi des întîlnite, în aceste cazuri, valori crescute însoțind diverse afecțiuni, fără însă a avea o semnificație patologică. Timpul de înjumătățire a AFP în ser este de 5—6 zile, nefiind încă cunoscute modalitățile de metabolizare și locul unde este degradată (24).

Deși s-au făcut multe supoziții, speculații, analogii și experimente pe animale privind rolul AFP în organism, acesta nu este pe deplin elucidat fiind, în general, acceptate următoarele funcții:

— Funcția coloidosmotică, înlocuind albumina a cărei sinteză apare mai tîrziu în viața fetală;

— Funcția de transport și protecție a unor hormoni în cursul vieții intrauterine;

— Funcția imunoreglatoare, acționînd asupra celulelor T supresoare, pe care le activează diminuînd efectele fenomenelor de agresiune tip „grefă contra gazdă";

Pentru evaluarea reală a rolului determinării AFP în diagnosticul, prognosticul sau monitorizarea unor boli, este absolut necesară posibilitatea evidențierii unor valori serice mici (1—10 ng/ml), deci a utilizării unor teste suficient de sensibile și fiabile, cum sînt cele bazate pe tehnici imunoenzimatice (ELISA) sau radioimunologice (RIA).

Astfel, în condițiile în care adultul normal are valori medii ale AFP de 10 ng/ml, iar nivelul circulant maxim la gravidă (săptămînile 28—32)

este sub 500 ng/ml, gravidele cu valori peste 600 ng/ml au risc crescut, pînă la 98%, de a da naștere la un copil cu malformație congenitală, fiind pe deplin dovedit rolul AFP în diagnosticul prenatal al spinei bifida deschise, anencefaliei, meningomielozelor, atreziei esofagiene, nefrozei congenitale și omfalozei, a căror incidență este de 1,6 la 1000 nașteri. Urmărirea în dinamică a AFP serice la mame și corelarea acesteia cu date ultrasonografice pot duce la un diagnostic precoce și exact al malformațiilor congenitale (8, 51, 87).

Potrivit datelor actuale peste 90% din pacienții cu carcinom hepatic primitiv prezintă valori peste 20 ng/ml pînă la valori foarte mari de 100 ng/ml. Deși 10% din aceste tumori sînt nesecretante de AFP, valori peste 500 ng/ml sînt sugestive pentru boală. Valori peste 20 ng/ml sînt asociate și cu metastaze hepatice ale unor tumori pulmonare, pancreatice gastrice, de colon sau limfoame. Atunci cînd, fiind urmărite în dinamică, valorile AFP serice rămîn sub 150 ng/ml, este mai probabilă existența unor metastaze, în timp ce valorile care cresc în dinamică peste 150 ng/ml sugerează hepatocarcinomul primitiv. Valori peste 20 ng/ml sînt întîlnite și în fenomenele de regenerare hepatică după hepatite acute sau cronice; în ciroze, creșterea progresivă a AFP peste 100—300 ng/ml sugerează apariția unui proces neoplazic, hepatic. Coroborarea acestor valori cu alte date de laborator și cu ultrasonografia pot contribui la o reală îmbunătățire în diagnosticul precoce al afecțiunilor tumorale (92).

Pacienții cu teratoame maligne sau teratocarcinoame prezintă valori mult crescute ale AFP în proporție de 80—100%, iar cei cu seminom, corioepiteliom, disgerminom, în proporție de 60—70%, urmărirea în dinamică a valorilor serice fiind utilă în monitorizarea evoluției bolii sub tratament radio- sau chimioterapic (24).

Dintre afecțiunile netumorale care sînt însoțite de valori crescute ale AFP serice, cele mai importante sînt tirozinoza, fibroza chistică (mucoviscidoza), sindromul Down și ataxia-teleangiectatică.

II.2.3.2. ANTIGENUL CARCINOEMBRIONAR (ACE)

De la descoperirea sa, în 1965, de către Gold și Freedman, cînd s-a raportat stricta sa specificitate pentru tumorile de colon, ACE, proteină oncofetală, a constituit obiectul a numeroase cercetări care sugerează că această moleculă poate fi un marker relativ util într-o serie de afecțiuni (36).

ACE este un membru al unei familii complexe de antigene asemănătoare din care fac parte: antigene nespecifice cross reactive (NCA-1/NCA 50), glicoproteina normală (NGP), NCA 2, NCA 95/97, antigenul extras din tumoare, legat de ACE (TEX), care sînt sintetizate atît în țesuturile normale cît și în țesutul tumoral (36).

1. *Caracteristici fizico-chimice și imunochimice.* ACE este un antigen de suprafață celulară de natură glicoproteică, cu GM 200.000 D, mobilitate electroforetică la pH = 7—8,5 cu β-globulinele și pI = 4,5—4,8.

Structura primară a ACE a fost rezolvată la nivel de cADN, Proteina la adult constă dintr-un domeniu N-terminal (108 aminoacizi), 3 regiuni similare, fiecare de 178 de aminoacizi și un domeniu foarte hidrofobic C-terminal (26 de aminoacizi), care este regiunea prin care se face

inserția ACE în membrana plasmatică. După evaluarea aminoacizilor critici din structură, precum și a structurii secundare, s-a constatat că ACE are similitudini cu superfamilia imunoglobulinelor.

2. *Substanțe ACE- „like“*. O caracterizare completă a moleculei de ACE nu se poate face fără descrierea asemănării structurii și reactivității moleculei cu a altor molecule înrudite.

Molecula de ACE are multiple asemănări și cu molecula unui antigen numit NCA (non specific cross-reacting antigen) și aceea a moleculei de α_1-acid—glicoproteină. Compoziția de aminoacizi a ACE și NCA este aproape la fel. Secvența primilor 25 aminoacizi este identică la ACE și NCA, ea fiind diferită doar în poziția 21.

Serurile anti-ACE și anti-NCA reacționează cu ambele antigene, iar unii anticorpi monoclonali anti-ACE reacționează încrucișat cu molecule de NCA; reactivitate exclusivă pentru ACE au autoanticorpii, de unde concluzia că ei se formează față de un determinant specific.

Asemănarea între ACE și NCA este importantă la separarea moleculei de ACE din extractele tisulare și la reacțiile produse în kiturile de determinare a nivelurilor de ACE. Suscită de asemenea interes asemănarea între ACE și alfa-1-antitripsină și alfa-1-antichimotripsină; asemănarea fiind mai ales între lanțul proteic al ACE și lanțul proteic al centrului activ al celor două enzime (69).

3. *Modul de producere a ACE, nivel plasmatic*. Molecula de ACE este un antigen de suprafață celulară situat la nivelul glicocalixului celular. Sinteza sa are loc la nivel ribozomal după modelul clasic de sinteză a proteinelor.

În mod normal, ACE este sintetizat în celulele tubului digestiv embrionar și fetal între lunile 2—6 de gestație. Este important faptul că ACE este sintetizat numai în celulele tubului digestiv cu origine endodermală, iar cantitatea produsă crește progresiv către zona caudală a tubului digestiv și scade peste luna 6 de gestație.

Avînd în vedere prezența sa în viața fetală, se presupune că ACE are:

— Rol în recunoașterea și asocierea celulelor care, prin diferențiere celulară ulterioară, formează celulele tubului digestiv;

— Rol esențial în menținerea vitalității celulei incomplet diferențiate, ipoteză susținută de dispariția ACE după diferențierea celulară.

După diferențierea celulară, producerea de ACE se reduce pînă la sistare și, în mod normal, nu mai apare în viața adultă decît ca urme în ser.

Întrucît celulele tumorale sînt incomplet diferențiate este necesară producerea continuă de ACE, producere cu atît mai intensă cu cît numărul de celule nediferențiate — tumorale — este mai mare. La apariția metastazelor, nivelul de ACE sanguin este cu mult mai crescut decît în absența lor, mai ales în cazul metastazelor hepatice. Nu se cunoaște mecanismul prin care și alte celule adulte, vecine celulelor transformate malign, produc ACE; acest fenomen se constată atît la nivelul tubului digestiv, cît mai ales la nivelul metastazelor hepatice (54).

4. *Importanța clinică a ACE*. Valorile normale ale ACE oscilează între 0—10 ng/ml, valori mai mari de 20 ng/ml fiind o certitudine a procesului malign. În patologie, determinarea ACE are rol important în chi-

rurgia *tumorilor digestive, în speță colorectale.* Astfel s-au stabilit următoarele:

1. Tumorile Duke A extirpate de un chirurg experimentat nu necesită urmărire prin ACE.

2. Avînd în vedere că unii din pacienții cu tumori Duke B1, B2, C1 prezintă recidive și aproape unul din 2 pacienți cu tumori Duke C2 au recidive, se impune necesitatea urmăririi prin ACE alături de celelalte modalități de urmărire postoperatorie.

3. Determinarea ACE la 1—2 luni interval oferă cea mai mare posibilitate de detectare precoce a recurențelor, în primii doi ani postoperator.

Se propune ca indicator al apariției recidivei creșterea cu peste 5 ng/ml a ACE față de valorile imediat postoperatorii.

Dintre tumorile gastrointestinale, în afara celor colorectale, valori frecvent ridicate ale ACE pot fi întîlnite și în carcinoamele pancreatice și gastrice, ale cavității bucale, esofagului și intestinului subțire. Valorile ACE sînt asemănătoare celor din tumorile colorectale, cu mențiunea că și afecțiuni inflamatorii ale acestor organe pot determina unele creșteri ale ACE. În cazul pancreasului, prima valoare în legătură cu care se poate vorbi de o afecțiune malignă este de 40 ng/ml.

Cercetări efectuate în ultimii ani indică un posibil rol diagnostic al ACE într-o serie de alte afecțiuni. *În carcinoamele pulmonare,* ACE are valori ridicate în 73% din cazuri, 90% în carcinoame cu celule scuamoase, 88% în adenocarcinoame, 88% în carcinoame cu celule mici și 69% în carcinoame cu celule mari.

În cancerul mamar, se menționează relativ frecvent valori ridicate ale ACE, care sînt cu atît mai frecvente cu cît stadiul bolii este mai avansat. Studii recente arată, luînd ca valori normale sub 4 ng/ml, conform clasificării U.I.C.C., următoarea distribuție a valorilor pozitive: stadiul I = 14,8%, stadiul II = 23,7%, stadiul III = 73,1%.

În carcinomul vezicii urinare, ACE apare la valori ridicate în aproximativ 50% din cazuri. De menționat în acest caz că, în condițiile radioterapiei, valoarea ACE crește inițial, o dată cu accentuarea distrugerii tumorii, și scade ulterior după radioterapie.

Anticorpii monoclonali cu mare specificitate pentru ACE, marcați radioactiv sau conjugați cu citostatice, sînt astăzi utilizați și în completarea terapiei antitumorale după timpul operator, anticorpii făcînd posibilă o distrucție selectivă a celulelor tumorale, producătoare de ACE (69).

Cu ajutorul anticorpilor mono- și policlonali anti-ACE marcați cu ^{125}I se pot detecta preoperator tumoarea și metastazele ei la distanță, mai ales cînd acestea sînt inaccesibile examenului clinic, de laborator sau explorării intraoperatorii. Metoda este, se pare, mai utilă cînd se folosesc anticorpi monoclonali și cînd detectarea se face după folosirea simultană a anticorpilor marcați cu ^{125}I și ^{99m}Tc.

Determinarea ACE este un test util pentru diagnosticul și monitorizarea evoluției unor tumori.

II.2.3.3. ALŢI MARKERI TUMORALI

CA 19—9 este unul din primii anticorpi monoclonali utilizaţi pentru determinarea de markeri tumorali şi a fost realizat de Koprowski şi colab. în 1979. Antigenul identificat de acest anticorp monoclonal se mai numeşte şi antigenul cancerului gastrointestinal. Este structural diferit de ACE. Determinarea CA 19—9 este singurul marker cu mare specificitate şi sensibilitate pentru cancerul pancreatic, indiferent de stadiu. Permite o bună discriminare între cancerul pancreatic şi pancreatită. În detectarea carcincamelor colorectale este echivalent cu ACE, iar asocierea celor 2 teste permite o creştere a sensibilităţii la 74% (86).

CA—125 este un determinant antigenic definit de un anticorp monoclonal ridicat la o linie celulară de carcinom epitelial ovarian. Cantităţi mici din acest antigen se găsesc în ţesutul adult, în celulele mezoteliale ale pleurei, pericardului, peritoneului, precum şi ca şi component epitelial al trompelor uterine, endometrului şi endocervixului. Studiile imunohistochimice au arătat că nu este prezent în ovarul adult şi fetal dar se găseşte în cantitate mare în adenocarcinoamele ovariene. Determinarea CA—125 este foarte importantă în monitorizarea evoluţiei carcinomului epitelial ovarian, nivelul seric fiind direct corelat cu regresia, stabilizarea sau progresiunea bolii şi fiind astfel util pentru urmărirea rezultatelor tratamentelului chirurgical, radiologic şi chimioterapic (4).

CA 15—3 este un antigen tumoral asociat tumorilor mamare şi se determină utilizînd 2 anticorpi monoclonali cu specificitate diferită. Deşi nu este un antigen specific tumoral, se detectează frecvent în cancerul mamar (peste 80%). Se utilizează în urmărirea bolnavelor cu cancer mamar, respectiv în detectarea metastazelor sau recăderilor şi în evaluarea eficienţei terapeutice.

MCA este o glicoproteină cu GM de 350.000 D. Este formată dintr-un lanţ de aminoacizi şi dintr-un număr mare de lanţuri de carbohidraţi încărcate negativ, proprietate caracteristică glicoproteinelor asemănătoare mucinei (de unde şi denumirea *M*ucin-like *C*arcinoma-associated *A*ntigen = MCA). Prin studii imunohistochimice s-a arătat că acest antigen este produs de majoritatea tipurilor de cancer mamar şi în cantitate mică de cîteva ţesuturi epiteliale normale (de exemplu, ducte din sîn şi rinichi).

Determinarea MCA în ser nu poate fi utilizată ca test screening pentru identificarea pacientelor cu cancer mamar. Este utilă însă dacă se determină valorile în dinamică, permiţînd surprinderea din vreme a recidivelor şi monitorizarea terapiei. Se poate utiliza şi în stadializarea tumorilor mamare.

Gamaseminoproteina este un antigen specific izolat şi purificat din lichidul seminal uman. Prin imunohistochimie s-a arătat că este produs de prostată şi secretat în lichidul seminal. Are o GM de aproximativ 27—30.000 D şi este similară ca structură cu kalikreina pancreatică umană. Fiind specific localizată în prostată şi secretată în lichidul seminal şi avînd o concentraţie de 10 ori mai mare decît fosfataza acidă prostatică, este un parametru util pentru diagnosticul cancerului prostatic. După iniţierea tratamentului, nivelul seric se reduce şi creşte în caz de recidivă a bolii.

În afara acestor markeri imunologici, există o serie de markeri biochimici, în special enzime: γ glutamiltransferază, fostatază acidă, glicosiltransferazele. Date asupra acestora se găsesc în volumele anterioare de *Biochimie clinică* (21) şi în prezentul volum la pag. 222).

II.2.4. ALFA-1-GLICOPROTEINA ACIDĂ

Este o glicoproteină denumită în trecut şi orosomucoidul sau α-1-seromucoidul care face parte din grupul proteinelor de fază acută (10). Are greutate moleculară de 45.000 D şi este alcătuită dintr-un singur lanţ

polipeptidic la care sînt atașate, prin intermediul asparaginazei, cinci lanțuri oligozaharidice (10% din moleculă); molecula este stabilizată spațial de două punți disulfidice. Lanțul polipeptidic prezintă o structură omoloagă cu a unui fragment peptidic din molecula de IgG și haptoglobină. Electroforeza la pH izoelectric permite evidențierea a 7 benzi ce atestă diferitele variante din cadrul polimorfismului genetic (50). Sînt cunoscute 3 variante genetice; SS, FF și FS. Este sintetizat în ficat și poate fi determinat nu numai în ser sau plasmă, ci și în alte lichide biologice; urină, lichid cefalorahidian, pleural, sinovial. Are valori serice între 44—140 mg/dl și o viteză de înjumătățire în circulație de 5 zile. Este catabolizată tot la nivel hepatic, molecula „îmbătrînită" fiind blocată la nivelul membranei hepatocitului prin componența glucidică. Deși structura proteinei este cunoscută, funcțiile ei în organism sînt încă insuficient clarificate.

Totuși, din date clinice și experimentale s-a constatat că:

— Crește reactiv alături de celelalte proteine de fază acută;

— Contribuie alături de transcortină la transportul corticosteroizilor și progesteronului;

— Contribuie alături de transcobalamină la legarea și transportul vitaminei B12;

— Acționează ca imunoreglator în procesul maturării limfocitelor.

Valoarea diagnostică a proteinei constă în apartenența acesteia la grupul de proteine de fază acută, nivelele serice ajungînd pînă la dublarea valorii serice normale. La 3—5 zile de la debutul unui fenomen inflamator acut asociat unor distrucții tisulare, se ating concentrații serice maxime, revenirea la valorile normale făcîndu-se în aproximativ trei săptămîni de la vindecare. Urmărirea concentrației serice este utilă în supravegherea evoluției, progresiunii sau atingerii unui proces cronic inflamator și în monitorizarea terapiei în procesele cronice degenerative, pneumopatii cronice, glomerulonefrite cronice, boala de iradiere, poliartrita reumatoidă, infarctul miocardic, hemodializa cronică, tumori maligne, cînd prezintă valori crescute concordant cu evoluția procesului patogen. Este mai scăzută la noi-născuți sau în sarcină decît la adultul sănătos.

În sindroamele de malnutriție sau hepatopatii cronice și ciroze prezintă valori sub nivelul normal, cauzate de scăderea ratei de sinteză iar în sindromul nefrotic prezintă valori scăzute datorită pierderilor urinare. Deși nu are o mare specificitate pentru o anume afecțiune („specificitate de boală"), are însă o mare specificitate pentru procesul inflamator („specificitate de proces").

II.2.5. TRANSFERINA

Transferina (cu sinonimul siderofilină) este o glicoproteină cu migrare electroforetică în β1 care aparține grupului de proteine de transport; are rol important în transportul fierului în organism (82). Este sintetizată la nivel hepatic avînd o greutate moleculară de 90.000 D și concentrație serică de 200—400 mg/dl, reprezentînd aproximativ 50% din

β-globuline. Structura moleculei constă într-un lanț polipeptidic (94% din moleculă) și două lanțuri glucidice identice, unde se găsesc situsurile de legare a ionilor de fier. Apotransferina (molecula liberă de ioni de fier) este o proteină incoloră, după încărcarea cu două molecule de Fe^{3+} devine roșiatică. Prin electroforeză în gel de amidon a fost identificat un polimorfism genetic al proteinei, guvernat de trei gene alele codominante C, B, și D cu subtipuri C1, C2 etc., generînd peste 20 variante fenotipice de transferină fără însă a fi evidențiabile diferențe imunochimice sau unele particularități biochimice în legarea Fe^{3+}. Cantitatea totală de transferină din organismul unui adult sănătos este de 7—15 g, din care cea mai mare parte este circulantă, putînd fi însă identificată și în lichidele biologice: lichidul cerebrospinal, sinovial, corpul vitros, urină, bilă. La adultul normal, 1/3 din valoarea transferinei din circulație este saturată cu Fe^{3+}, fiind transportoare a peste 99% din fierul seric (50). Totuși situsurile de legare a cationilor de Fe nu sînt specifice, putînd interacționa și cu alți ioni metalici: Zn^{2+}, Cu^{2+}, Co^{3+}, Mn^{2+} Cr^{3+}. Timpul de înjumătățire a concentrației serice a transferinei este de 7—10 zile, zilnic fiind metabolizate 4—7% din proteina circulantă la nivelul celulelor epiteliului tubular renal, la nivel gastrointestinal și tegumentar. Concentrația plasmatică de transferină poate fi evaluată fie prin metode imunologice, fie indirect prin determinarea capacității totale de fixare a fierului și care, în mod normal, este de 300—360 μg Fe/100 ml plasmă.

Funcția fiziologică esențială a transferinei este de a transporta fierul de la nivel intestinal la nivel hepatic, splenic, muscular și mai ales la nivelul măduvei hematoformatoare, unde ionul este implicat în sinteza hemoglobinei, mioglobinei, a unor enzime, ca cele din lanțul respirator, sau participă ca și cofactor la sinteza unor proteine. Dinamica metabolismului complexelor transferină-fier este deosebit de accelerată, complexele formate la nivel intestinal sau în circulație cu Fe^{3+} liber, fiind legate în decurs de 60—120 min la receptorul de transferină al hepatocitului, eritroblastului sau a unor celule ale sistemului reticulohistiocitar, unde, la un pH 7,0, fierul este cedat.

O altă funcție importantă a transferinei este aceea de a lega fierul liber din circulație, concentrații mai mari de 10 μg/l Fe^{3+} liber avînd repercusiuni negative asupra reacțiilor enzimatice tisulare. Atît *in vivo* cît și *in vitro*, transferina exercită un puternic efect bacteriostatic, menținut chiar și dacă serul este încălzit la 56°C, efect conferit de marea aviditate a proteinei pentru Fe^{+3} pe care îl blochează, nepermițînd bacteriilor utilizarea cationului în cadrul propriului lor metabolism.

Atransferinemia congenitală constă în anemie hipocromă microcitară, debutată în copilărie, cu nivele serice ale transferinei extrem de scăzute (0—40 mg/dl), nefiind clar precizat dacă efectul genetic constă în deficitul de sinteză sau de reglare a sintezei proteinei. Tratamentul constă în perfuzii cu ser uman sau transferină umană purificată. Au fost descriși și autoanticorpi antitransferină, de clasă IgG care blochează funcția de transport a transferinei, generînd tabloul clinic al unei hemosideroze. Transferina serică este mult crescută în astfel de cazuri dar saturarea ei cu Fe^{3+} este deficitară, Fe^{3+} liber din circulație fiind mult crescut.

Nivelul seric al transferinei este util în diagnosticul diferențial al unei anemii hipocrome microcitare; anemia feriprivă prezintă valori ale

sideremiei scăzute cu transferinemie crescută, în timp ce în anemiile secundare unor procese cronice infecţioase (tbc), boli maligne, inflamaţii acute, insuficienţă hepatică sau renală sînt scăzute atît transferinemia cît şi sideremia. Talasemia şi anemia falciformă se caracterizează prin sideremie crescută şi transferinemie scăzută. În hepatita virală acută sînt constatate uşoare creşteri ale transferinemiei, care însă scad în hepatitele cronice, ajungînd la valori semnificativ mai mici la bolnavii cu ciroză. În sindroamele nefrotice, este descrisă o hipotransferinemie cauzată de pierderi la nivel glomerular. Raportul valorilor de clearence IgG/transferină a fost utilizat în trecut ca indice de selectivitate a proteinuriilor, metoda fiind astăzi înlocuită de alte procedee mai informative, cum este electroforeza proteinelor urinare în gel de poliacrilamidă.

Valori extrem de scăzute ale transferinei au fost semnalate într-un caz de aritroleucemie acută (37), precum şi în cazul de psoriazis eritrodermic şi eritropatic descris de I. Baciu şi colaboratorii (2), evoluînd cu hipobetaglobulinemie, anemie şi manifestări de carenţă în fier heminic.

Determinarea transferinei în lichidul cefalorahidian are valoare diagnostică în unele afecţiuni neurologice, prezentînd valori scăzute în scleroza multiplă, paralizii progresive, meningite (îndeosebi cea tbc), tumori cerebrale şi valori crescute în epilepsie.

II.2.6. FIBRONECTINA

Fibronectina (FN) face parte, împreună cu fibrinogenul, vitronectina, factorul von Willebrand din grupul glicoproteinelor de adeziune. Aceste glicoproteine sînt distincte structural şi imunologic, dar sînt asemănătoare prin funcţia lor şi prin prezenţa în structura primară a tripeptidului Arg-Gly-Asp. Respectivul tripeptid (Arg-Gly-Asp) joacă un rol esenţial în adeziunea celulară, el fiind recunoscut de receptori celulari specifici denumiţi integrine (41).

FN este o glicoproteină evidenţiată în sînge, limfă, lichidul interstiţial ca şi în matricea extracelulară. Denumirea provine de la termenii latini „fibra" şi „nectera", semnificînd funcţia de legătură, conexiune pe care o are. Se găseşte în formă solubilă în lichidele biologice sau insolubilă în matricea de ţesut conjunctiv, membranele bazale, glicocalixul unui număr mare de celule. În culturi de celule a putut fi identificată la suprafaţa fibroblastelor, celulelor endoteliale, macrofagelor, hepatocitelor, fiind în parte secretată în mediul de cultură (94).

Atît fibronectina plasmatică (FN) cît şi cea tisulară reprezintă un complex molecular cu greutate moleculară de 440.000—445.000 D, constînd în două lanţuri polipeptidice de 220.000—230.000 D legate prin punţi disulfidice. Izolată şi parţial purificată în 1948 de Morrison şi colaboratori, FN a purtat mai multe denumiri printre care „globulina insolubilă la rece", „galactoproteina", „proteina de suprafaţă celulară", „antigenul solubil al fibroblastului" etc. (1, 40). FN solubilă şi cea din matrice sînt asemănătoare din punct de vedere antigenic dar diferă sub aspect biochimic şi funcţional. Se consideră astăzi existenţa unei familii de fibronectine cu variabilitate în compoziţia chimică, domeniile structurale

ale macromoleculei sau funcţionalitatea acestor domenii. Molecula FN prezintă o serie de domenii structurale evidenţiate prin studii de spectroscopie, denaturare tranzitorie, digestie enzimatică, domenii care prezintă o afinitate mare pentru anumite componente ale suprafeţei celulare (ale fibroblastelor, granulocitelor, stafilococului aureu) pentru colagenul nativ sau denaturat, fibrină, fibrinogen, actină, heparină, factorul XIII etc. (figura 2.6.). Multiple domenii structurale, cu diferită extindere în molecula FN, asigură o largă funcţionalitate acestei proteine, de la îndeplinirea unui rol structural de adeziune şi susţinere pînă la opsonizare bacteriană sau interacţiune cu celulele imunoefectoare (40, 94). Fiind o moleculă cu greutate moleculară mare, cu multiple interacţiuni şi domenii structurale, cu o mare susceptibilitate la proteoliză, fragmentele derivate din degradarea proteolitică a FN sînt „peptide active", cu rol important reglator în sinteza acestei glicoproteine dar şi cu posibilităţi de a interfera funcţional cu molecula intactă. FN funcţionează ca mediator între celule şi componentele matricei extracelulare, inclusiv fibrele de colagen şi fibrină, influenţînd astfel creşterea şi diferenţierea celulară, locomoţia celulară şi fagocitoza.

FN are rol în formarea ţesutului conjunctiv, promovînd şi direcţionînd fibrilogeneza colagenului, multe dintre aceste funcţii fiind îndeplinite de forma fibrilară (de la suprafaţa celulelor). Forma solubilă a FN pare a fi mai inertă. Conversia FN solubile în fibrilară poate fi indusă de agenţi poliionici ca heparina, spermidina sau heparansulfatul cu care acţionează frecvent ca şi cofactor în interacţiunea celulă-matrice. Totodată acidul hialuronic poate inhiba adeziunea celulei la matrice prin mascarea fibrilelor de fibronectină.

FN solubilă poate fi utilă în diagnosticul de laborator ca şi în urmărirea evoluţiei unor afecţiuni. Determinarea acesteia din plasmă se poate face cu mijloace imunochimice; imunodifuzie radială, electroimunodifu-

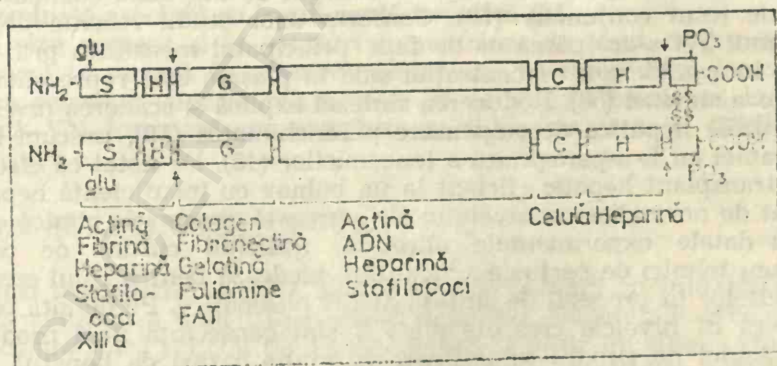


Fig. 2.6. Reprezentarea schematică a domeniilor structurale ale fibronectinei plasmatice. S-domeniul de legare al stafilococului aureu; H-domeniul de legare al heparinei; G-domeniul de legare al gelatinei; G-domeniul de legare celulară; Glu-rest glutamic implicat în legarea catabolizată de FXIIIa. Alte substanţe care se leagă de anumite domenii sînt indicate sub schemă. Săgeţile indică sediile cele mai frecvente de scindare proteolitică a fibronectinei. FAT = factor de activare a transformării celulare.

zie sau ELISA. Valoarea normală este de 25—40 mg/dl plasmă (19). Determinarea ei din ser este incorectă deoarece FN ia parte la formarea cheagului și se consumă astfel în cursul coagulării. Studiile efectuate cu FN marcată cu ^{125}I au demonstrat că această glicoproteină este rapid catabolizată, avînd un timp de înjumătățire de 20—30 ore. Ca urmare, în fiecare oră, aproximativ 5% din FN este degradată, procesul fiind compensat de o viteză de sinteză corespunzător de accelerată de 0,71 mg/Kg/h (68).

Nivelul plasmatic al FN scade semnificativ după intervenții chirurgicale laborioase, septicemii, traumatisme majore, arsuri, coagulare intravasculară diseminată, îndeosebi cînd aceasta din urmă este asociată unor traumatisme sau septicemii (77). Explicația acestei scăderi constă în faptul că FN acționează ca opsonină pentru particulele nebacteriene, ca resturi tisulare de colagen, detritusuri celulare, complexe imune circulante, proteine denaturate sau produși ai coagulării intravasculare diseminate (monomeri de fibrină, fragmente de plăcuțe). Scăderea FN circulante reflectă pe de-o parte consumul ei ca opsonină, favorizînd reținerea complexelor opsonizate în sistemul reticulohistiocitar, dar totodată sugerează și antrenarea ei în aria de leziune tisulară, în cadrul procesului de vindecare, la formarea matricei conjunctive. În aceste cazuri, administrarea la pacienții cu șoc septic sau traumatisme a unui crioprecipitat din plasmă proaspătă, bogat în FN, duce la restabilirea nivelului plasmatic al FN cu influențarea favorabilă a septicemiei, insuficienței respiratorii și duratei bolii (70, 77).

FN a fost mult studiată în legătură cu procesul de malignizare și invadare tumorală. S-a observat că în culturi celulele tumorale sintetizează mult mai puțină FN decît celulele similare nemalignizate. Totodată a fost observată o fragmentare proteolitică însemnată a FN cu eliberarea unui număr mare de fragmente derivate din hidroliză, care ar putea fi utilizate ca un potențial marker al progresiunii tumorale, procesul de invaziune al celulelor tumorale fiind strîns legat de hidroliza enzimatică a matricei de țesut conjunctiv (70). Conform unor studii recente privind metabolismul FN s-ar părea că de fapt principalul mecanism prin care se ajunge la o scădere a concentrației sale în plasmă este reprezentat de o reducere a sintezei (68). Reducerea sintezei explică și scăderea nivelului FN în cirozele hepatice decompensate parenchimatos (19), precum și în cursul terapiei cu L-asparaginază a leucemiilor (45). De notat că efectuarea unui transplant hepatic eficient la un bolnav cu insuficiență hepatică este urmat de normalizarea nivelului FN. Această observație clinică coroborată cu datele experimentale obținute, utilizînd culturi de celule hepatice sau tehnici de perfuzie a ficatului, pledează pentru rolul esențial al hepatocitelor în procesul de sinteză al FN plasmatice. Pe de altă parte, se consideră că nivelele crescute ale FN sînt consecința unei producții crescute. Astfel de situații se întîlnesc în multe cazuri de hepatită cronică evoluînd cu procese de regenerare hepatică, în sindromul nefrotic, la obezi și la subiecți cu hiperlipoproteinemie tip IIb și IV (19, 76).

Deși nivelul plasmatic de FN nu este modificat în poliartrita reumatoidă au fost evidențiate concentrații crescute ale acesteia în lichidul sinovial, sugerînd o sinteză locală asociată bolii; totodată au fost evidențiate și o gamă largă de fragmente proteolizate ale FN care au un rol

important în opsonizare și chemotaxie, fiind activ implicate în patogeneza bolii (12).

A fost descris și un deficit genetic de sinteză al FN; plăgile acestor pacienți se vindecau greu și prezentau importante depozite de cheloid.

II.2.7. VITRONECTINA/PROTEINA S A SISTEMULUI COMPLEMENT

Vitronectina (VN) este o glicoproteină cu o greutate moleculară de 75.000 D și o concentrație serică de 20—40 mg%. Cantități mari se găsesc în lichidul amniotic și urină. Inițial a fost denumită și factorul de migrare celulară, datorat proprietății ei de a determina adeziunea celulară. Clonarea recentă a ADN al VN a permis identificarea cîtorva domenii distincte în această moleculă. VN conține întregul peptid al somatomedinei B, o secvență Arg-Gly-Asp (41), prin care permite adeziunea celulelor, și un domeniu foarte bazic, care leagă heparina. Acest domeniu este implicat funcțional în rolul VN ca proteină neutralizatoare a heparinei, reglînd astfel extinderea inhibării enzimelor de coagulare prin intermediul antitrombinei III-heparinei. Domeniul amintit este implicat de asemenea în inhibarea formării complexului terminal litic al C5b-9 prin formarea complexului SC5b-9 citolitic inactiv (vezi „Sistemul complement"). Date recente arată că VN inhibă și activitatea litică a perforinei, proteină produsă de limfocitele T citotoxice, cu rol similar complexului C5b-9 (88)

Sediul major de sinteză pentru VN serică este reprezentat de ficat, fapt atestat și de valorile scăzute întîlnite în ciroze hepatice decompensate. Nivelul seric în aceste cazuri se corelează pozitiv cu colinesteraza serică și factorul X al coagulării. Nivelul seric nu se modifică în tumori cu metastaze, în leucemiile acute și este scăzut în coagularea intravasculară diseminată asociată cu insuficiență hepatică (14).

VN este prezent și în țesuturi în matricea de țesut conjunctiv, jucînd un rol important în aderarea celulelor. Aderarea celulelor se face printr-un receptor specific pentru VN de la nivelul celulelor. Există și dovezi că VN formează un complex cu PAI_1 pe care îl stabilizează.

II.2.8. BETA$_2$MICROGLOBULINA

A fost descoperită în 1968 în urina unor pacienți cu intoxicație cronică cu cadmiu și a unor cazuri de tubulopatii congenitale. Are greutate moleculară mică (11.800 D), fiind constituită dintr-un singur lanț polipeptidic incluzînd 100 de aminoacizi. Două punți disulfidice conferă moleculei formă sferică (71). Este secretată la suprafața membranelor tuturor celulelor nucleate (îndeosebi a limfocitelor) ca lanț ușor al complexului major de histocompatibilitate (MHC) — clasa I. Complexul MHC reprezintă o regiune antigenică membranară prezentă la toate speciile de mamifere și a cărei tipizare este importantă în transplantul de organe. În ultimul timp, s-a constatat că antigenele HMC intervin nu numai în

transplant ci și într-o mare varietate de forme ale răspunsului imun celular, îndeosebi în modularea răspunsului limfocitelor T citotoxice. Legăturile lanțului ușor de β2-microglobulină în cadrul complexului MHC sînt de tip necovalent, fiind sugerat astfel rolul pe care acesta îl are în menținerea conformației spațiale a lanțului greu (figura 2.7). Deși complexul MHC este codificat de gene de pe cromozomul 6, genele care codifică sinteza β2 microglobulinei sînt pe cromozomul 15.

Turn-overul acestui complex la suprafața membranelor celulare este sursa cea mai importantă de β2 microglobulină în ser și alte lichide biologice. Concentrația serică este sub 0,3 mg/dl, indiferent de vîrstă și sex. Avînd greutate moleculară mică, trece în filtratul glomerular dar este reabsorbită și metabolizată de celulele tubulare renale. Cantitatea filtrată la nivelul membranei bazale glomerulare este de 80—160 mg/24 h, dar excreția în urină se limitează la 0,12—0,40 mg/24 h. (71). Studiile experimentale au evidențiat reabsorbția tubulară la nivelul celulelor tubului contort proximal prin pinocitoză la nivelul porțiunii luminale, „în perie" a celulei, veziculele endocitate fiind degradate de enzimele lizozomale. Prezența ei în urină este expresia saturării mecanismului de reabsorbție, afectarea tubulară găsindu-și o fidelă expresie în creșterea nivelelor urinare de β2 microglobulină. Existența unui catabolism extrarenal este sugerată de faptul că, la bolnavii nefrectomizați bilateral, rămîne la valori constante, 1—5 ani de la nefrectomie, chiar dacă epurarea prin hemodializă nu depășește 1 mg. După transplant renal, pacienții elimină

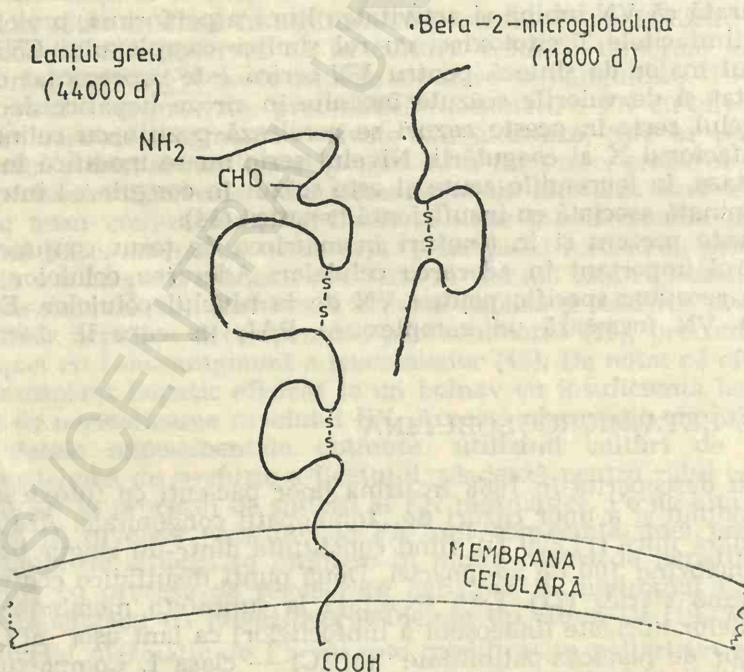


Fig. 2.7. Schema structurii moleculelor de la suprafața celulelor codificate de MHC clasa I.

50—60 mg/24 h, ceea ce corespunde unei perioade de sinteză şi catabolizare completă de 5—8 ore.

Concentraţia serică a β2 microglobulinei reflectă echilibrul între producţie şi catabolism. Nu este suficient cunoscută modalitatea de eliberare în mediul extracelular. Nivelul seric creşte la toţi pacienţii cu viteza de filtrare glomerulară scăzută (glomerulopatii, nefropatia diabetică, insuficienţa renală acută şi cronică), determinarea concentraţiei serice fiind o metodă simplă şi exactă în detectarea afectării renale minime ca şi în urmărirea efectelor tratamentului. În absenţa insuficienţei renale determinarea concentraţiei urinare este o metodă sensibilă de apreciere a funcţiei tubulare renale (26). Datorită variaţiilor în concentraţia urinară a β2 microglobulinei în funcţie de diureză, aceasta trebuie raportată la debitul urinar sau la concentraţia creatininei din acelaşi eşantion urinar, în general fiind considerate patologice concentraţii mai mari de 0,3 mg/dl urină. Determinarea urinară a β2 microglobulinei are deosebită utilitate în studii epidemiologice privind depistarea precoce a intoxicaţiilor cronice cu metale grele, a nefropatiei endemice balcanice, sau a nefropatiilor interstiţiale medicamentoase. Creşterea excreţiei de β2 microglobulină este observată înainte de evidenţierea, prin metode curente, a proteinuriei. Pentru diagnosticul tubulopatiilor sau nefropatiilor interstiţiale, dozarea ei în urină este o analiză mai precisă şi mai utilă decît electroforeza proteinelor urinare.

Modificări ale concentraţiei serice a β2-microglobulinei reflectă importante evenimente patogenice în hemopatiile maligne. Astfel, în leucemia limfocitară cronică se modifică paralel cu evoluţia bolii, progresiunea ei şi regresiunea sub tratament fiind nereflectate de β_2m chiar dacă nu se corelează întotdeauna cu numărul de leucocite circulante (52). În boala Hodgkin, concentraţia serică este crescută şi se corelează relativ bine cu stadiul bolii. În alte limfoame există o mare variabilitate a nivelului circulant al proteinei, acesta nereflectînd fidel evoluţia sub tratament şi prognosticul bolii. Urmărirea concentraţiei β_2 microglobulinei în lichidul cefalorahidian şi creşterea raportului concentraţiei ei în lichidul cefalorahidian/ser este foarte importantă pentru aprecierea extinderii la nivel cerebral a leucemiilor sau limfoanelor (52).

În mielomul multiplu există o variată gamă de răspuns a β_2 microglobulinei în ser de la concentraţie normală pînă la 1—2 mg/dl, fără a exista o corelaţie cu scăderea vitezei de filtrare glomerulară sau tipul de paraproteină. Totuşi s-au observat corelaţii între concentraţia ei serică şi masa tumorală sau creşterea concentraţiei serice a paraproteinei. Totodată nivelele crescute permit diferenţierea clară între o gamopatie malignă şi una benignă, în cazul celei din urmă nivelul plasmatic al β_2 microglobulinei nefiind modificat. Pe de altă parte, creşterea exprimată a β_2 microglobulinei în astfel de cazuri implică un prognostic nefavorabil (26). În stadiile avansate ale tumorilor mamare, au fost raportate nivele serice crescute, ca şi în tumorile gastrointestinale, fără ca această investigaţie să poată fi însă folosită ca marker tumoral.

Au fost comunicate de asemenea cazuri de bolnavi cu insuficienţă renală cronică care, în condiţiile unei hemodialize cronice de lungă durată, prezentau nivele serice mult crescute ale β_2 microglobulinei şi depunerea în organe a unui tip de fibrile de amiloid alcătuit din β_2 microglobulină.

Acest tip de amiloid are o mare afinitate pentru zona tunelului carpian, producînd, prin compresiunea nervului median, sindromul de tunel carpian (32).

Este crescută în serul pacienților cu colagenoze, ca și în lichidul sinovial al celor cu poliartrită reumatoidă. Au fost raportate de asemenea valori crescute, în sindromul de imunodeficiență dobîndită (SIDA), creșterea fiind atribuită atît efectului citopatogen viral, cît și eliberării de la suprafața limfocitelor infectate dar incompetente imunologic datorită infecției virale.

Crește în lichidul amniotic din primele luni de sarcină, apoi scade la nivele normale, în timp ce în serul gravidelor crește progresiv cu luna sarcinii. Este crescută în serul de cordon ombilical, în urina și serul noului născut, în contextul imaturității funcției renale (71).

II.2.9. PROTEINA C-REACTIVĂ

Conceptul de „proteine de fază acută" a fost introdus în 1930 la descoperirea primei proteine din cadrul acestora, proteina C-reactivă (CRP). A fost astfel denumită deoarece în prezența ionilor de Ca^{2+} precipită cu polizaharidul C al pneumococului. Primele determinări ale CRP aveau la bază această proprietate; determinările fiind insuficient de sensibile, nu au putut-o decela în serul indivizilor sănătoși, ci doar în cel provenit de la pacienți cu infecții acute. Cu ajutorul metodei radioimunologice s-a demonstrat prezența ei și în serul indivizilor sănătoși, la valori sub 0,5 mg/dl (47). Aproape toate proteinele care fac parte din grupul proteinelor de fază acută (tabelul 2.5.) sînt prezente în cantități relativ mari

Tabelul 2.5

Principalele caracteristici ale proteinelor de fază acută

Proteina	Concentrația mg/dl	Procentajul creșterii	Mobilitate electroforetică	Greutate moleculară
Celuloplasmina	25—40	50	α2	151000
C3	80—120	50	β	180000
α1-glicoproteina acidă	55—140	200—400	α1	45000
α1-antitripsina	200—400	200—400	α1	54000
α1-antichimiotripsina	30—60	200—400	α1	68000
Haptoglobina	40—180	200—400	α2	100000
Fibrinogenul	200—450	200—400	β	340000
Proteina C-reactivă	0,5	1000—3000	γ	105000
Proteina serică A a amiloidului	10	1000—3000	α1	12000

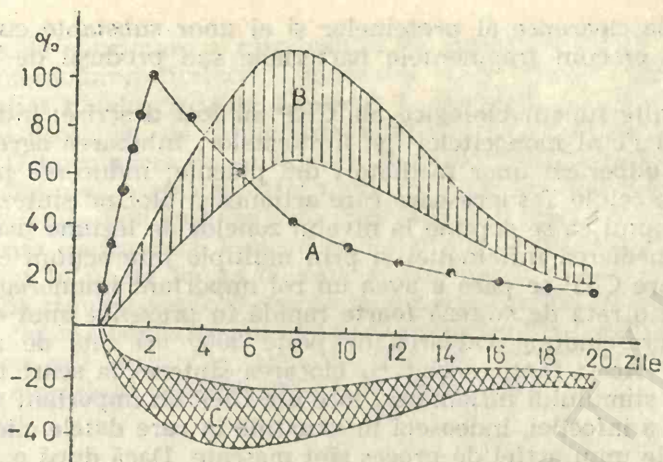


Fig. 2.8. Comportamentul diferitelor proteine plasmatice in cursul reacţiei de fază acută.

şi uşor de apreciat prin tehnicile uzuale de imunoprecipitare, excepţie făcînd CRP. Proteinele de fază acută au în comun caracteristica de a creşte în ser de mai multe ori sub influenţa unei distrucţii tisulare asociată unui proces inflamator acut sau cronic (figura 2.8). Nivelul lor seric creşte nu atît prin eliberarea din stocuri preformate cît mai ales prin creşterea sintezei la nivel hepatic, iar viteza lor de producere şi secreţie se pare că se află sub controlul unor mediatori umorali derivaţi direct sau indirect de la locul de distrucţie tisulară sau inflamaţie. Există o mare variabilitate de stimuli care induc sinteza şi eliberarea proteinelor de fază acută de la terebentina sterilă la fracţiuni subcelulare din focarul inflamator, citokine, prostaglandine, complexe proteaze-inhibitori proteazici, fracţiuni de complement, radicali superoxizi (48).

CRP este alcătuit din cinci subunităţi polipeptidice aranjate spaţial sub formă de disc pentamer şi are o greutate moleculară de 105.000 D. Se leagă de polizaharidele prezente în peretele bacteriilor, fungilor sau protozoarelor, interacţionează cu fosfolipidele (lecitina) şi sfingolipidele (sfingomielina) care sînt constituente majore ale membranelor celulare. Afinitatea cea mai mare o are pentru fosforil-colină (lecitină), iar legarea de fosfolipide şi polizaharide este dependentă de Ca^{2+}.

Una din cele mai importante proprietăţi a CRP este că, odată legată de o membrană, activează sistemul complement pe calea clasică (prin interacţiunea cu C1q) la fel de eficient ca şi IgG; Activarea complementului are ca şi consecinţă eliberarea unor peptide active chemoatractante (C3a, C5a) şi liza celulei prin alterarea membranei indusă de complexul terminal C5b-9. Asemănător imunoglobulinelor, CRP acţionează ca şi opsonină şi agent citolitic cu rol în medierea fenomenelor inflamatorii, sugerîndu-se chiar posibilitatea ca aceasta să fie o proteină primitivă de apărare a organismului. Funcţia ei principală este aceea de a contribui

la procesul de clearence al proteinelor și al unor substanțe cu rol toxic în organism, precum fragmentele bacteriene sau produșii de degradare tisulară.

Printre alte funcții biologice ale CRP au fost descrise: interacțiunea cu receptorul Fc al monocitelor și limfocitelor; inhibarea agregării plachetare și a eliberării unor mediatori din plăcuțe; inducerea proliferării unei clone de celule T-supresoare care acționează blocînd sinteza de anticorpi. Prin faptul că se depune la nivelul zonelor de leziune tisulară contribuind la medierea inflamației și prin multiple interacțiuni cu celulele imunoefectoare CRP se pare a avea un rol important imunoreglator (48).

CRP are o rată de sinteză foarte rapidă în prezența unui eveniment inflamator (crescîndu-și valoarea de peste 3000 ori față de normal în 12—24 ore). Acest fapt, asociat cu blocarea sintezei la scurt timp după îndepărtarea stimulului inflamator, face din CRP un important marker de monitorizare a infecției, îndeosebi în situațiile în care datele clinice și hematologice ale unui astfel de proces sînt mascate. Dacă după o intervenție chirurgicală nivelul ei seric nu scade sau chiar crește în primele 14 zile de supraveghere, se poate bănui dezvoltarea unei infecții postoperatorii. La nou-născuți s-a dovedit a fi deosebit de utilă și sensibilă în urmărirea recidivelor septicemice sau meningeale. În cazul unor pacienți care au primit tratament cu corticosteroizi sau imunosupresoare sau în cazul unor pacienți cu leucemie, concentrația serică a CRP poate fi foarte utilă în diferențierea pacienților cu infecție față de cei fără infecție (10).

Multe din bolile cronice sînt asociate cu distrucții tisulare care duc la o persistență a modificărilor serice ale proteinelor de fază acută. Totuși unele colagenoze (lupus eritematos sistemic, sclerodermia, dermatomiozita) sînt asociate cu mici creșteri ale CRP. Urmărirea nivelelor serice ale CRP în lupus este însă deosebit de utilă, sugerînd o infecție intercurentă care poate exacerba boala.

Există încă multe stări patologice evoluînd cu inflamații cronice a căror extindere și evoluție spre o fază activă se corelează cu creșterea nivelului seric al CRP. Astfel, în reumatismul articular acut, poliartrita reumatoidă, boala Crohn, artrita cronică juvenilă, spondilita anchilozantă, sindromul Reiter, vasculite sistemice sau cutanate, sindromul Behçet, rectocolita hemoragică, concentrația serică a CRP este considerată un criteriu obiectiv de activitate a bolii. Este prezentă în lichidul de ascită, pleural, articular și cefalorahidian de natură inflamatorie.

II.2.10. PROTEINA SERICĂ „A" A AMILOIDULUI

Proteina serică A a amiloidului (SAA) este o proteină de fază acută cu greutate moleculară mică, de aproximativ 12.000 D, relativ recent descoperită. Descoperirea originală s-a bazat pe izolarea ei din depozitele din amiloidoza secundară. Este compusă dintr-un singur lanț polipeptidic cu 76 aminoacizi și o mică heterogenicitate interspecie. Utilizînd antiser față de această proteină, a fost descoperită o variantă imunologică identică, în ser, denumită SAA.

Respectiva proteină este sintetizată în ficat precum și la nivelul fibroblastelor, plasmocitelor și neutrofilului. Una din funcțiile biologice

este aceea de suprimare a răspunsului de sinteză a anticorpilor prin alterarea interacțiunii limfocit T-macrofag. Determinări radioimunologice au evidențiat nivele crescute ale SAA la pacienții cu amiloidoză secundară, spre deosebire de amiloidoza familială în care se constată valori normale. Determinarea ei ca marker al amiloidozei este de mică importanță. Pe de altă parte, nivelele mult crescute au fost detectate în sarcină și în unele boli inflamatorii acute. Nivele crescute au fost raportate în poliartrita reumatoidă, lupusul eritematos sistemic, mielomul multiplu, limfoame și în unele forme de cancer (îndeosebi în cancerul pulmonar). Scade după chimioterapie și crește la o nouă reactivare a procesului tumoral. În lichidul sinovial din poliartrita reumatoidă prezintă nivele comparabile cu cele serice; în lichidele sinoviale septice nivelele SAA sînt mult mai mari decît cele din poliartrita reumatoidă.

II.2.11. PROTEINELE SISTEMULUI COMPLEMENT

II.2.11.1. STRUCTURA ȘI MECANISMELE DE ACTIVARE ALE SISTEMULUI COMPLEMENT

Proteinele sistemului complement aparțin unui grup de proteine plasmatice organizate în sisteme, denumite „de activare enzimatică în cascadă" în care sînt incluse proteinele coagulării, fibrinolizei și sistemului generator al kininelor.

Componentele acestor sisteme enzimatice circulă într-o formă inactivă, de proenzime, activarea lor făcîndu-se în lanț, cel mai frecvent prin mecanism proteolitic succesiv. Sînt sisteme enzimatice deosebit de utile organismului deoarece prin mecanismele lor efectoare și prin multiplele căi reglatoare permit un răspuns rapid și adecvat la stimulii activatori (55).

Sistemul complement, cuprinzînd 19 proteine serice, are un rol important în mecanismele de apărare ale organismului, fiind direct implicat în liza celulară, chemotaxie, opsonizare, imunoaderență, fagocitoză și anafilaxie (5). Principalele caracteristici ale proteinelor sistemului complement sînt redate în tabelul 2.6.

Activarea sistemului complement survine în trei stadii succesive:

a. Generarea C3-convertazei;

b. Clivarea C3;

c. Asamblarea componentelor litice terminale (figura 2.9).

a. *Generarea C3-convertazei*. Acest proces poate fi declanșat pe două căi distincte: calea clasică și calea alternativă, implicînd modalități diverse de activare și componente proteice distincte. Activarea imunologică a căii clasice se face prin complexele imune sau agregatele moleculare conținînd IgM sau subclase de IgG (IgG 1,, IgG 3); IgA, IgD și IgE nu participă la formarea de complexe imune cu rol în activarea complementului. În mecanismul activării pe calea clasică, Clq, care are formă discoidală, electronomicroscopic fiind asemănător unui buchet cu șase lalele, interacționează, prin cele șase situsuri de combinare, cu regiunea CH_2 a imunoglobulinelor și în prezența ionilor de Ca^{2+}, scindează componen-

Tabelul 2·6

Principalele caracteristici ale proteinelor sistemului complement

Proteina	Mobilitate electroforetică	Greutate moleculară	Concentrație serică mg/dl	Fragment de clivare	Funcții
1	2	3	4	5	6
Clq	γ_2	410000	7	—	Recunoașterea activatorilor căii clasice
Clr	β	85000	3,5	Clr	Clivarea Cls, după legarea Clq la un activator
Cls	α	85000	3,1	Cls	Clivează C4 și C2
C2	β1	117000	2,5	C2a, C2b	Substrat al Cls; C2a face parte din complexul C4b2a cu rol în clivarea C3 și C5
C4	β1	200000	40	C4a, C4b, C4c, C4d	Substrat al Cls; C4b se fixează la nivelul celulei țintă formînd C4b2a
C3	β1	185000	90	C3a, C3b, C3bi, C3c, C3d	Substrat al convertazei clasice și alternative; C3a-anafilatoxină; C3b împreună cu B formează C3bB; C3bi ligand al receptorului CR3, C3d ligand al receptorului CR2
B	β2	95000	25	Ba, Bb	Formează C3bB; Bb în complexul C3bBb clivează C3 și C5
D	α	25000	0,2	—	Clivează B
C5	β1	200000	8,5	C5a, C5b	Substrat al C5-convertazei clasice și alternative, C5a anafilatoxină, C5b leagă C6
C6	β2	130000	7,5	—	Legare de C5
C7	β2	120000	5,5	—	Formează C5b-7
C8	γ1	155000	8	—	Se leagă de C5b-7

1	2	3	4	5	6
C9	α	79000	8	—	Mai multe molecule de C9 se leagă formînd complexul C5b-9
C1-Inh	α_2	105000	18	—	Inhibă activarea C1
C4bp	β	1,2—1,5× 10	25	—	Disociază C4b2a
H	β1	150000	50	—	Disociază C3bBb
I	β1	90000	3,4	—	Clivează C3b și C4b
Proteina S	inter α	84000	50	—	Se leagă de C5b-7 in faza fluidă făcînd complexul C5b-9 citolitic inactiv
P	γ_2	220000	2,5	—	Stabilizarea complexului C3bBb

tele Clr și Cls care, la rîndul lor scindează un fragment cu greutate moleculară de 8000 D (C4a) din molecula de C4; fragmentul C4b, rămas după îndepărtarea peptidului C4a, se prinde hidrofob de membrana celulară în vecinătatea complexului antigen-anticorp care a inițiat activarea (figura 2.9). Atît C4b, prins de membrana celulară, cît și cel rămas liber, în faza fluidă, interacționează reversibil cu C2 în prezența ionilor de Mg^{+2}, eliberînd un peptid de 74.000 D și alcătuind complexul C4b2a, denumit convertaza C3 a căii clasice. Există posibilitatea activării căii clasice și neimunologic, prin interacțiunea C1q cu glicozaminoglicanii, heparina, protamina, ADN sau prin acțiunea unor enzime ca tripsina, plasmina, catepsina G leucocitară, direct asupra componentelor Clr și Cls (15). Reglarea acestui prim stadiu al activării căii clasice se face prin intermediul unor inhibitori: Cl inhibitor, glicoproteină care se cuplează stoichiometric cu Clr și Cls blocînd acțiunea lor asupra componentei C4; C4bp (C4 binding protein) care accelerează disocierea spontană a complexului C4b2a; factorul I, care, sub influența C4b2a clivează fragmentul C4b în subfracțiuni, C4c și C4d (tabelul 2.6) (43).

Activarea căii alternative se face prin intermediul polizaharidelor din peretele celular, endotoxine gram-negative, veninul de cobră, IgA, factorul nefritic și al unor paraziți (tripanosoma, schizostoma). Alți activatori ai căii alternative sînt reprezentați de membranele de hemodializă, cristalele de colesterol și celulele transformate în urma infecției cu un virus. Toți acești activatori oferă o așa-numită „suprafață activatoare“ care, prin caracteristicile ei biochimice, permite componentelor căii alternative să interacționeze pentru formarea C3-convertazei fără a fi in-

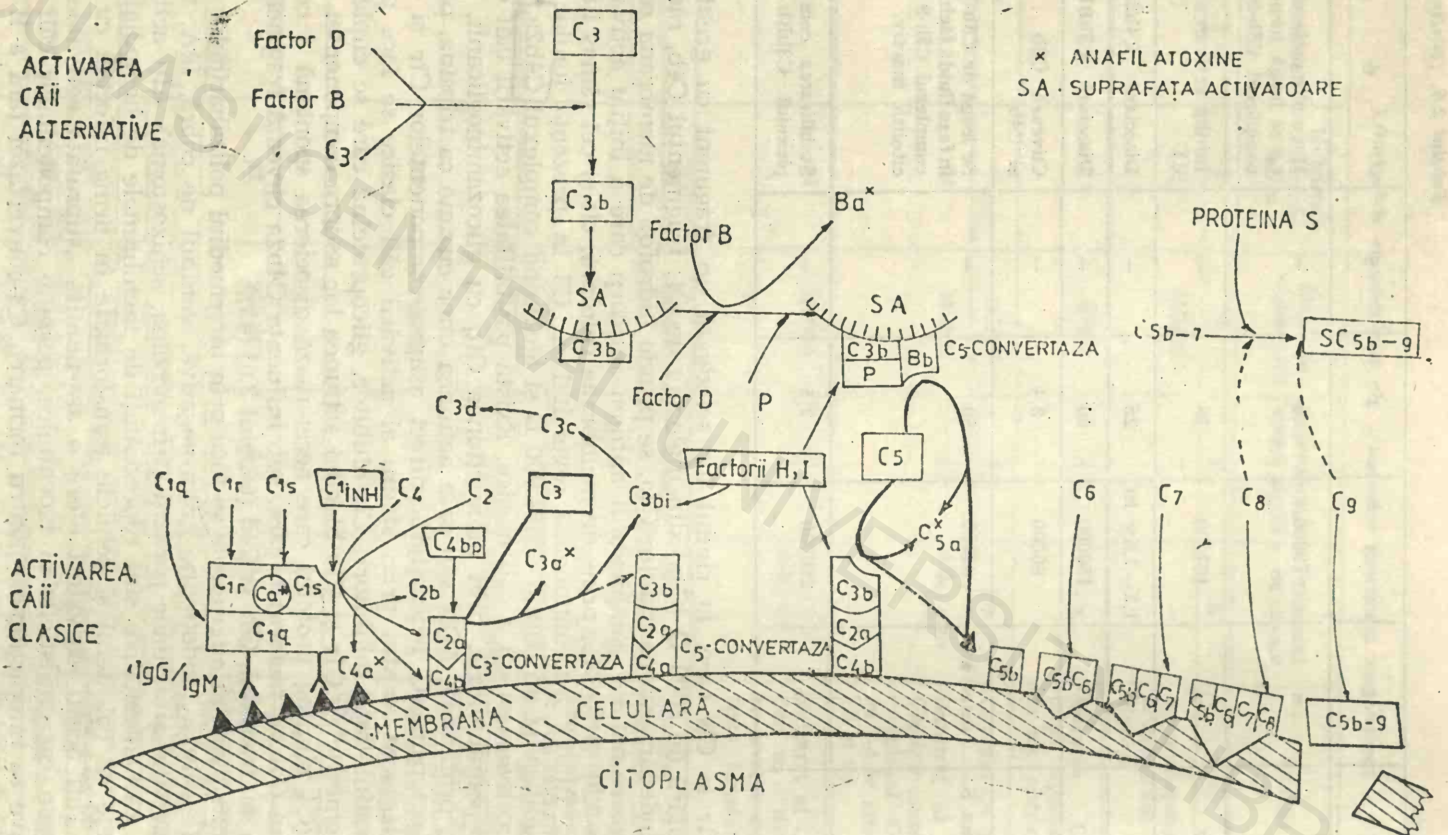


Fig. 2.9. Schema activării sistemului complement pe calea clasică și alternativă.
S A = suprafața activatoare.

hibate de proteinele de control, factorii H și I (44, 60). C3b, indiferent cum este produs, dar putînd proveni din clivarea unor mici cantități de C3, care are loc în plasma normală, se leagă de suprafața activatoare, apoi formează un complex cu factorul B în prezența ionilor de Mg^{2+}. Complexul C3bB are o slabă acțiune enzimatică pînă cînd factorul D (prezent întotdeauna în formă activă în ser) clivează o parte din molecula factorului B din complex, generîndu-se astfel complexul C3bBb, cu o mare capacitate de a cliva C3 și de a genera noi molecule de C3b care să reacționeze, în continuare, cu noi molecule de factor B (44).

Interacțiunea C3b cu factorul B este foarte asemănătoare interacțiunii C4 cu C2, existînd și o mare asemănare moleculară între C3 și C4, respectiv C2 și factorul B. Activitatea enzimatică a complexului C3bBb este mult crescută în urma stabilizării acestuia de properdină (P) care îi crește durata de viață și este inhibată de proteina H a cărei funcție este de a accelera disocierea complexului C3bBb, chiar dacă este stabilizat de properdină. Factorul H acționează și ca un cofactor în fenomenul de clivare proteolitică a C3bBb de către factorul I.

b. *Clivarea C3*. Acest proces este, din punct de vedere cantitativ, evenimentul major în activarea complementului. După îndepărtarea de la capătul N-terminal din molecula sa a unui fragment de 9000 D, fragmentul C3a cu important rol chemotactic și anafilactic, rezultă fragmentul C3b care posedă o mare capacitate de legare hidrofobă cu suprafața activatoare dar și o mare instabilitate, inactivîndu-se în cîteva milisecunde. Dacă C3b activat nu se leagă de suprafață, devine C3b inactiv și este în continuare clivat în faza fluidă în C3c și C3d (figura 2.10). (49). C3b activat, fixat de membrană lîngă locul de legare a C3-convertazei (C4b2a, C3bBb), modifică acțiunea acesteia spre componentul C5 pe care îl clivează în C5a (GM: 15000 D) și C5b care se leagă puternic la suprafața membranei celulare. Ca și C3a, C5a are proprietăți chemotactice și anafilactice.

c. *Asamblarea componentelor litice terminale*. Asamblarea componentelor terminale se realizează prin intermediul C5b care exercită, pentru o scurtă perioadă, capacitatea de a reacționa stoichiometric cu C6 și respectiv cu C7 formînd complexul C5b67 care este ancorat în membrană (5). Legarea unei molecule de C8 și a mai multor molecule de C9 la complexul C5b-7 permite inserția lui completă cu formarea unui canal transmembranar ce poate duce la liza celulară prin alterarea schimburilor de apă și ioni (șoc osmotic). În cursul asamblării lor, componentele C5b — C9 expun determinanți neoantigenici, apăruți ca rezultat al unor modificări conformaționale ale proteinelor din complex, neoantigenele permițînd diferențierea complexului C5b-9 de proteinele individuale care îl compun (5). Prezența neoantigenelor complexului C5b-9 în țesuturi este un argument clar al activării in situ a sistemului complement, cu medierea leziunii tisulare și a procesului inflamator local (5, 61, 62, 75, 90). Deși funcția litică a complementului este efectivă în cazul apărării organismului față de o gamă largă de bacterii, unele virusuri, unii paraziți, există și agenți patogeni care sînt rezistenți la acest tip de apărare (60). Totuși, prin medierea procesului inflamator, respectiv prin efectul chemotactic al fragmentelor C3a, C4a, C5a, asupra celulelor imune efectoare, sistemul complement își completează posibilitățile de intervenție

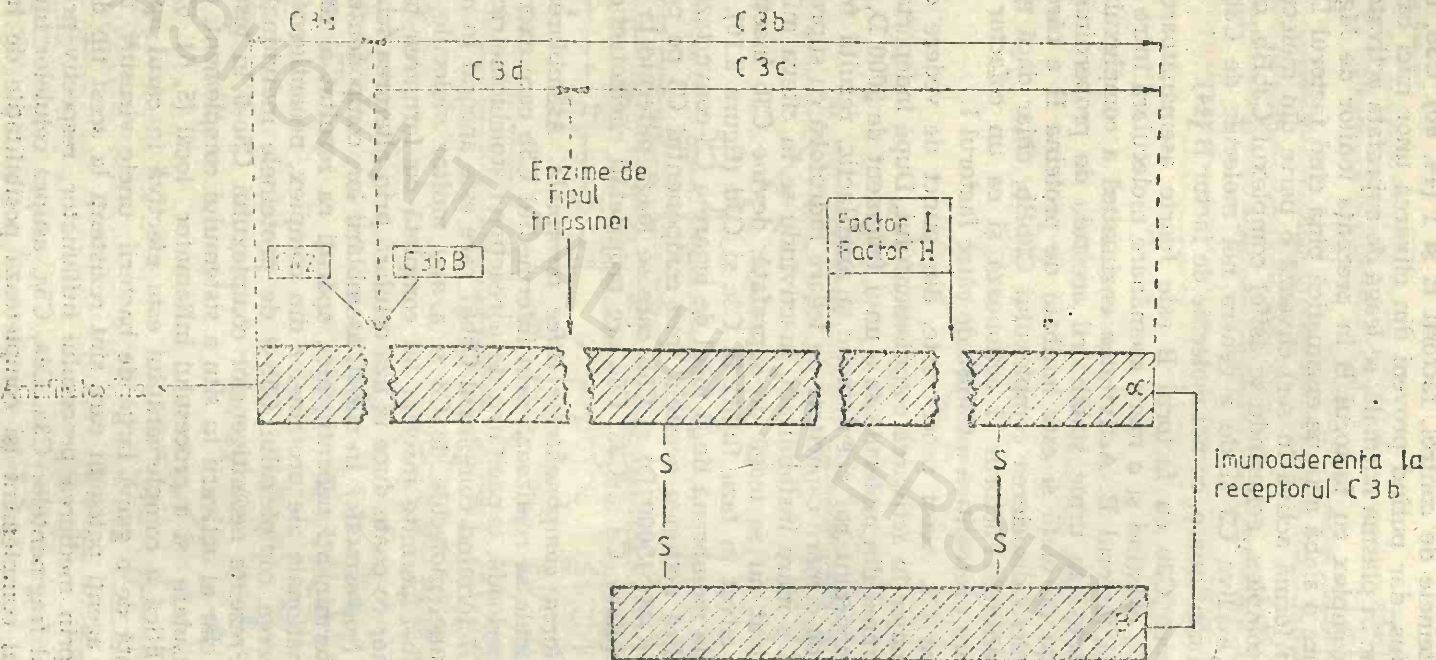


Fig. 2.10. Schema fragmentării moleculei de C3

în fenomenele de apărare. Celulele nucleate sînt mai rezistente la liza indusă de complement, ele avînd posibilitatea de a îngloba prin fagocitoză regiunile membranare afectate de complexele C5b-9 care suferă apoi un proces de digestie intracitoplasmatică (5).

Dacă asamblarea complexului C5b-9 se face în faza fluidă, complexul este blocat de proteina S care, prin generarea complexului SC5b-9, anihilează posibilitățile citolitice ale complementului. Deși lipsit de efecte citolitice, complexul SC5b-9 exercită un rol în promovarea procesului inflamator.

Proteina S. Proteina S a sistemului complement (diferită de proteina S a coagulării are o migrare electroforetică inter-α, o greutate moleculară de 84.000 și o concentrație serică de 20—40 mg/dl. Este sintetizată în hepatocite și fibroblaste. Pe lîngă funcția de blocare a complexului C5b-9, interacționează cu antitrombina III, protejînd trombina de acțiunea acesteia. Studii de clonare moleculară au demonstrat identitatea proteinei S cu vitronectina, proteină descrisă ca o componentă a matricei solubile de țesut conjunctiv, asemănătoare fibronectinei, aflată în majoritatea organelor și favorizînd aderarea celulelor la membranele bazale (37).

Factori membranari care inhibă activarea sistemului complement. Celule umane prezintă în structura membranelor glicoproteine de suprafață, cu rol de protecție față de activarea complementului omolog. Două astfel de proteine au fost bine caracterizate și individualizate: factorul de accelerare a degradării (DAF) și factorul de restricție omoloagă (HRF). DAF acționează asupra C2a și Bb și le disociază de C4b și C3b respectiv, prevenind astfel asamblarea convertazelor C3 și C5. HRF leagă factorii C8 și C9 ai sistemului complement prevenind formarea complexului C5b-8 și polimerizarea C9. Acești factori sînt absenți în membrana eritrocitelor bolnavilor cu hemoglobinurie paroxistică nocturnă, determinînd o sensibilitate crescută la liză a eritrocitelor la complementul autolog.

II.2.11.2. IMPLICAȚII PATOGENETICE ALE ACTIVĂRII SISTEMULUI COMPLEMENT

Studiul activării sistemului complement este util în înțelegerea mecanismelor patogenetice ale unor afecțiuni, putînd fi utilizat în diagnosticul și urmărirea evoluției unor boli. În general, noțiunile privind rolul complementului în patogeneza bolilor a derivat, în cea mai mare parte, din examinarea nivelului seric al diferitelor componente (tabelul 2.7.) sau din activitatea globală exprimată prin CH_{50} (complement hemolitic total 50%). Aceste determinări statice trebuie interpretate ca un rezultat al sintezei și catabolismului, în contextul patogenetic al fiecărei afecțiuni.

Nivele scăzute ale complementului seric total sînt întîlnite la pacienți cu defecte genetice de sinteză, colagenoze, glomerulopatii, boli hepatice severe sau tulburări de nutriție. Cele mai comune creșteri ale nivelului seric al complementului se întîlnesc în procese inflamatorii

Tabelul 2.7

Nivelul seric al componentelor complementului în diferite boli

Boala	CH50	Clq	C2	C4	C3	C3d	C5	B	SC5b-9
Colagenoze									
Lupus eritematos sistemic	↓	↓	N↓	↓	↓	N↑	N↓	N↓	N↑
Crioglobulinemie cu vasculită	↓	↓	N↓	↓	N↓	↑	N	N	—
Poliartrită reumatoidă severă	N↓	N↓	N	N↓	N↓	↑	N	N	↑
Miozită, sclerodermie, poliartrită, formă moderată, periarterită nodoasă, spondilită anchilozantă	N↑	N↑	N↑	N↑	N↑	↑	N↑	N↑	N↑
Boli renale									
Glomerulonefrită post-streptococică acută	↓	↓	↓	↓	↓	↑	N↓	N↓	—
Glomerulonefrita membranoproliferativă	N	N	N	N	↓	↑	↓	↓	N↑
Glomerulonefrite cronice, sindromul Goodpasture	N	N	N	N	N	N↑	N	N	N↑
Boli hepatice									
Hepatita cronică activă	N↓	N	N	N↓	N↓	↑	N	N	↑
Ciroza hepatică	N↓	N↓	N↓	↓	↓	↑	N	N↑	↑
Ciroză biliară primitivă	N	N	N	N	N	↑	N	↑	—
Septicemia	↓	N	N	N	↓	↑	↓	↓	N

acute și infecții (8, 60). Concentrații crescute au mai fost întîlnite în unele boli hepatice active, după intervenții chirurgicale, infarct miocardic acut, cancere, diabet zaharat, sarcină, poliartrită reumatoidă, reumatism poliarticular acut, febră tifoidă, spondilită anchilozantă, sclerodermie (57, 81). Totuși interesul major este centrat astăzi pe nivelele scăzute ale componentelor de complement, îndeosebi cele asociate unor concentrații crescute de complexe imune circulante și unde scăderea s-ar datora unor mecanisme patogenetice de activare și consum. Între aceste boli sînt incluse lupusul eritematos sistemic, glomerulonefritele cu patogeneză imună, vasculitele, poliartrita reumatoidă, endocarditele bacteriene, malaria, hepatita virală acută, crioglobulinemia și rejetul de grefă.

Lupusul eritematos sistemic (LES) este considerat un prototip al bolilor mediate prin complexe imune. Unele tipuri de complexe imune circulante sau depuse în țesuturi precum și unele complexe imune formate *in situ* activează complementul care mediază leziunile tisulare și întreține un răspuns inflamator cronic cu valențe degenerative asupra funcției și structurii organelor în care evenimentele mediate imunologic au loc. În LES au fost constatate astfel nivele scăzute circulante ale C1, C4, C2, C3, C5, sugerînd activarea căii clasice prin intermediul complexelor imune. Nivelele scăzute ale properdinei sau factorului B, raportate de unele studii, au fost interpretate ca o activare și un consum al căii alternative asociată fenomenelor generale de activare. Totodată a fost

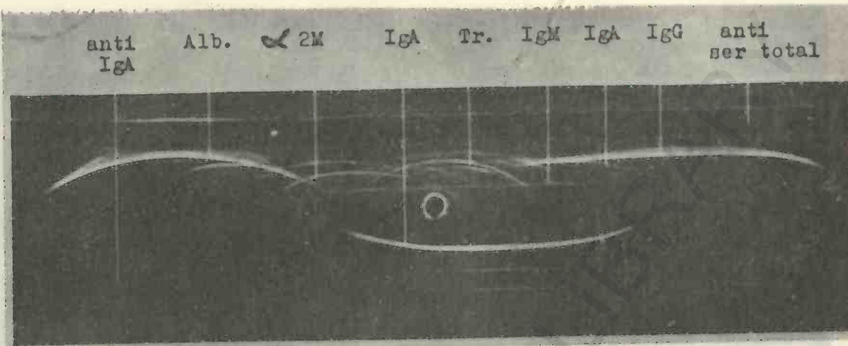


Fig. 2.1. Aspectul imunoelectroforetic al serului normal (Alb = albumină, α_2M = α_2-macroglobulina, Tr = transferina).

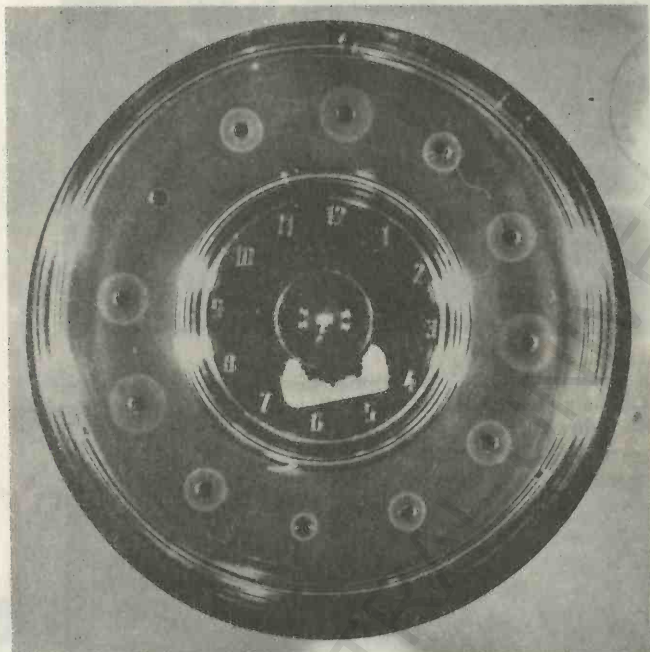


Fig. 2.2. Aspectul unei imunodifuzii radiale Mancini pentru determinarea IgA serice.

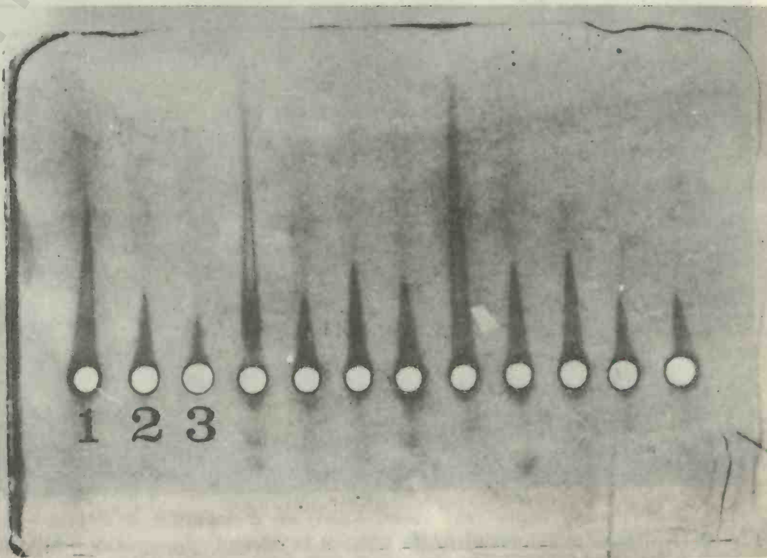
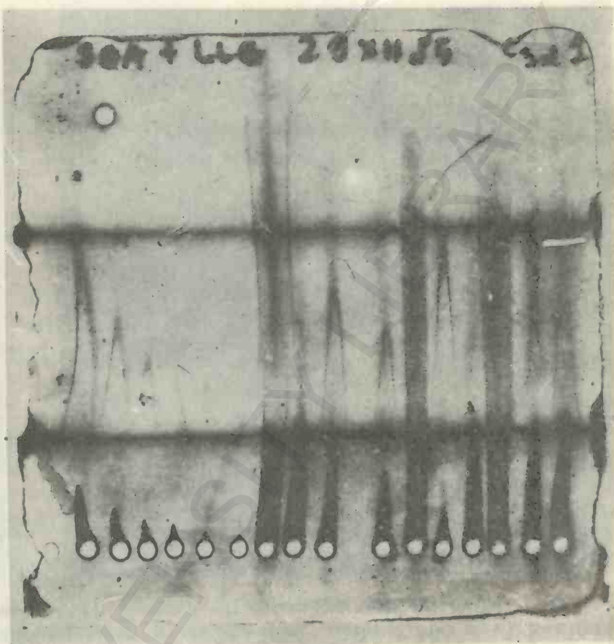


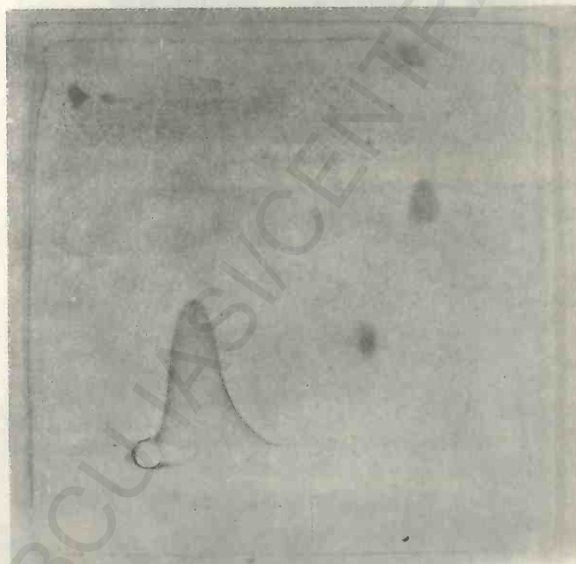
Fig. 2.3. Electroimunodifuzie Laurell pentru determinarea antigenului factorului von Willebrand (vWAg). Primele trei „rachete" sînt date de un amestec de plasme normale, nediluat (1), diluat 1/2 (2) și în diluție de 1/4 (3). De notat sensibilitatea metodei care este în măsură a detecta concentrații minime de vWAg (valori normale 1—2 mg/dl).

Fig. 2.11. Depozite fluorescente de C5b—9 la nivelul glomerulului dispuse mezangial şi de-a lungul anselor precum şi a arteriolei aferente într-un caz de glomerulonefrită mezangioproliferativă (imunofluorescenţă indirectă, x250)

Fig. 2.12. Depozite fluorescente de C5b—9 la nivelul glomerulului, tuburilor şi arteriolei aferente într-un caz de glomerulonefrită acută poststreptococică (imunofluorescenţă indirectă, x250)

Fig. 2.13. Electroimunodifuzie in dublu strat („Double decker") pentru determinarea C3d. Primul strat de agaroză conţine inglobat antiser anti-C3c, care epuizează acest antigen din molecula de C3. Al doilea strat conţine antiser anti-C3d, rachetele obţinute fiind proporţionale cu cantitatea de C3d din plasma recoltată pe EDTA.





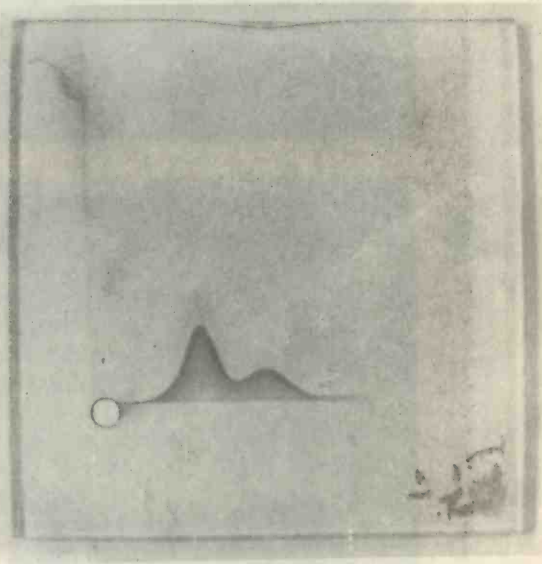
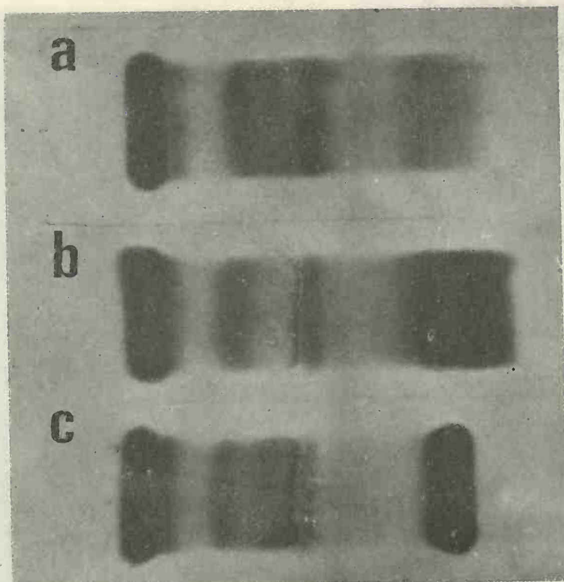


Fig. 2.14. Activarea complementului in contact cu membrana de hemodializă *in vitro* demonstrată prin electroforeza bidimensională: A. ser normal inainte de incubare; B. ser după 30 min de la incubarea cu membrana de hemodializă (se observă clivarea C3, cu apariţia unui fragment cu migrare mai rapidă C3c).



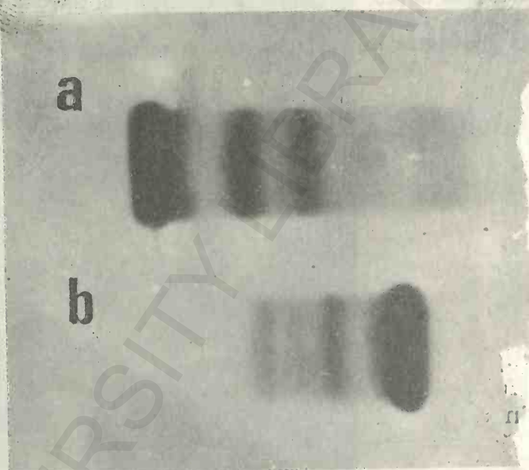
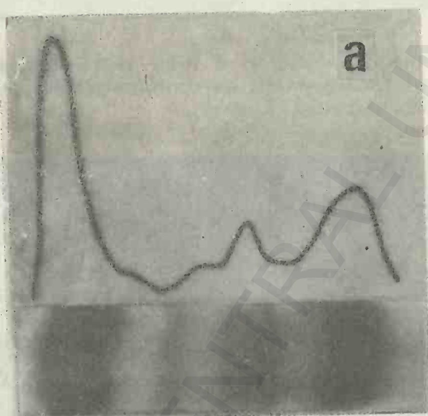
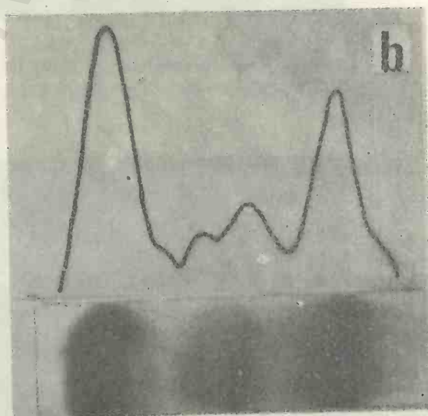
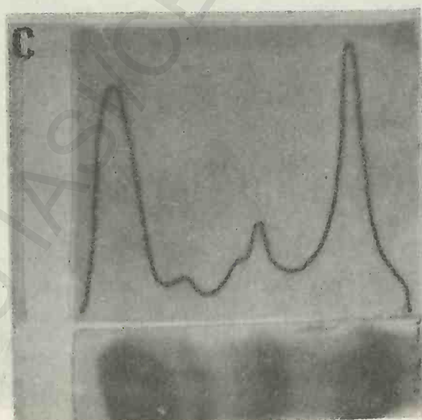


Fig. 2.17. Aspectul proteinogramei in agaroză din: A. ser normal (a), cu proliferare policlonală a gamaglobulinelor (b) şi cu proliferare monoclonală a gamaglobulinelor (c); B. intr-un caz de mielom multiplu fă[ră] paraproteină in ser (a), dar cu aceasta prezentă in urină (b).







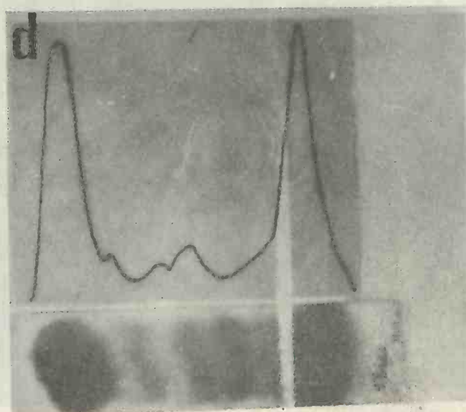


Fig. 2.18. Aspectul proteinogramei pe hirtie in evoluţie intr-un caz de plasmocitom solitar, iniţial fără par[a]proteină evidentă in ser (γ-2,5 g/dl) şi cu apariţia, in cursul evoluţiei, a unui aspect tipic „in pisc" (γ-4,7 g/d[l])

semnalată și o scădere a sintezei de C3 la acești bolnavi. Nivelele crescute ale complexului SC5b-9 în circulație, la pacienții cu LES activ, considerat un index mai fidel de monitorizare a bolii decît scăderea C3, C4 și CH50, precum și prezența depozitelor de C5b-9 evidențiate în rinichii sau dermul acestor pacienți atestă implicarea efectivă a activării complementului în patogeneza bolii (31, 75, 80).

Studiile de imunofluorescență au demonstrat depozitarea fracțiunilor de complement la nivel glomerular în majoritatea glomerulonefritelor (figurile 2.11 și 2.12). Ele pot fi asociate cu depozite de imunoglobuline sugerînd activarea prin complexe imune (glomerulonefrita lupică, glomerulonefrita poststreptococică etc.) sau în absența componentelor C1—C4 dar cu depozite de C3 și IgA (nefropatia cu IgA — boala Berger). În general, nu există o bună corelație între depozitele de C3 la nivel glomerular și scăderea concentrației acestuia în ser. Deși majoritatea glomerulonefritelor au depozite glomerulare de C3, doar puține sînt hipocomplementemice. Astfel în glomerulonefrita lupică, post-streptococică, cea din cadrul endocarditei bacteriene, a crioglobulinemiei esențiale și în nefrita de șunt (60) există o clară hipocomplementemie datorată activării căii clasice de către complexele imune circulante. Un caz special îl reprezintă glomerulonefrita membranoproliferativă, în cazul căreia activarea complementului se face pe calea alternativă prin intermediul așa-numitului *factor nefritic* (C3NeF), un autoanticorp de clasă IgG care se leagă de complexul C3bBb pe care îl protejează astfel de acțiunea inhibitorilor, menținînd calea alternativă într-o stare de continuă activare.

Chiar dacă valorile serice ale C3 sînt în limite normale, evidențierea activării complementului în glomerulopatii se poate face urmărind concentrația serică a produșilor de degradare a C3: C3d (figura 2.13) sau a complexului SC5b-9.

În cursul hemodializei cronice, au fost raportate fenomene generate de activarea sistemului complement în contact cu membrana de hemodializă (cuprophan, policarbonați) (figura 2.14), fenomene constînd în leucostazie pulmonară cu agregarea și degranularea granulocitelor, cu eliberarea de radicali superoxizi și apariția unor fenomene de tip alergic (spre exemplu astm bronșic), în cursul hemodializei și, mai tardiv, a sindromului de fibroză-calcinoză pulmonară.

În poliartrita reumatoidă a fost demonstrată activarea complementului prin evidențierea creșterii fragmentelor C3a, C3d și a complexului SC5b-9 în plasmă și în lichidul sinovial (57).

În vasculitele cu patogeneză prin complexe imune, mecanismul activării complementului este asemănător celui descris în cazul LES; complexele antigen-anticorp, care nu sînt reținute rapid în sistemul reticulohistiocitar, sînt depozitate în peretele vascular unde activează complementul și duc la leziune tisulară cu chemotaxia limfocitelor și monocitelor. Un asifel de mecanism este prezent în vasculita sistemică necrotizantă, periarterita nodoasă, vasculite hipersenzitive, purpura Henoch-Schönlein, crioglobulinemia mixtă. Un alt mecanism imunopatologic este cel în care predomină ca prim eveniment infiltratul cu limfocite activate de stimuli antigenici tisulari. Astfel de stimuli eliberează citokine care mediază infiltratul monocitar și distrucția tisulară care, la rîndul ei, este întreținută de activarea locală a sistemului complement (așa sînt granu-

lomatoza Wegener, arterita Takayasu, Horton, trombangeita Bürger, granulomatoza limfoidă) (80).

În hepatitele virale acute și în cele cronice active se întîlnesc valori crescute ale C3, C4 reactive la faza acută a bolii. De notat că un proces cronic degenerativ hepatic, cu episoade de reactivare și distrucție parenchimatoasă (îndeosebi în hepatitele cronice AgHBs pozitive) evoluează cu valori serice ale C3 și C4 scăzute prin consum în condițiile unor valori crescute ale imunoglobulinelor serice și a altor proteine de fază acută, ca și prezenței complexelor imune circulante. În ciroze, la consumul cauzat de activarea locală, se supraadaugă deficitul de sinteză hepatică a fracțiunilor de complement, scăderea acestora fiind bine corelată cu aceea a colinesterazei sau fibronectinei (19, 89).

Activarea locală a complementului a fost demonstrată în ateroscleroză și în infarctul miocardic acut prin evidențierea unor depozite de C5b-9 în regiunile arteriale cu leziuni aterosclerotice, precum și în ariile miocardice infarctate (75, 88).

Deficitul genetic al componentelor de complement poate fi clasificat în deficit homozigot heterozigot și disfuncția proteinei sau alotipic. Persoanele cu deficit homozigot al componentelor din calea clasică au, în general, lipsa activității CH50 („complement hemolitic total", tehnică ce apreciază activitatea funcțională globală a căii clasice) și absența completă a unei fracțiuni a sistemului complement; cele cu deficit heterozigot au o activitate CH50 de aproximativ 1/2 din valoarea normală și sub 1/2 din concentrația componentului deficitar. Incidența deficitelor homozigote este foarte mică (1/10000), însă a celor heterozigote este mai mare (1%). Majoritatea sînt autosomal dominante, cu frecvență egală la ambele sexe (71). Peste 2/3 din deficitele homozigote sînt asociate cu colagenoze, glomerulonefrite, vasculite. Alte deficite sînt asociate cu infecții recurente, îndeosebi cu Neisseria (tabelul 2.8). Este greu de semnalat deficitul unui component al complementului în contextul asocierii acestuia cu boli mediate imunologic, demonstrarea deficitului trebuind să fie făcută în perioadele de remisiune a bolii. Deficitele homozigote de C2 și C1-inhibitor sînt cel mai des întîlnite. Deficitele de C2 și C4 sînt frecvent asociate cu LES.

Deficitul de C1-inhibitor, parțial sau total, conduce la o activare în exces a căii clasice dar și a sistemului kininoformator, și în mai mică măsură a coagulării și fibrinolizei, alcătuind tabloul clinic al edemului angioneurotic; edeme apărute spontan, îndeosebi la membrele inferioare, la nivelul feței, pleoapelor, debutate brusc în condiții de efort fizic, traumatisme, infecții; edemele apar încă din copilărie în episoade repetate, la perioade variabile de timp. Pacienții nu au, în același timp, și erupții urticariene, asocierea acestora la edeme excluzînd diagnosticul de deficit al C1-inhibitorului. Puseele de acutizare a bolii sînt însoțite de astenie marcată, fatigabilitate, vomă, dureri abdominale pînă la crize de abdomen acut în absența febrei, a leucocitozei sau a apărării musculare abdominale. Edemul laringian este cea mai severă complicație a bolii și cauză majoră de mortalitate la acești pacienți. Din punct de vedere biologic pacienții prezintă nivele crescute ale C1 cu valori scăzute prin consum a C3, C4 și eventual C2. Nivelul C1-inhibitor în ser este mult scăzut sau absent. Totuși la 20% din cazuri, nivelul proteinei C1-inhibitor în ser este normal sau chiar crescut însă funcționalitatea lui este deficitară. Au fost descrise și cazuri de deficit al C1-inhibitor cîștigat, în afecțiuni ca: limfosarcom tip B, leucemie limfocitară cronică, macroglobulinemie Waldenström, mielom multiplu și crioglobulinemia esențială.

Tratamentul deficitului de C1-inhibitor se poate face utilizînd fie inhibitori ai proteazelor de tipul ε-aminocaproic (8—10 g/zi), în minimum două doze, sau ai acidului tranexamic (Cyclocapron, 1-6 g), fie utilizînd în cură cronică terapia cu androgeni de sinteză de tipul testosteronului

Tabelul 2.8

Deficite genetice ale componentelor sistemului complement

Component	Boala direct asociată
Calea clasică	
Clq	LES, GN
Clr	LES, GN, infecţii
Clr şi Cls	infecţii, LES
C4	LES, infecţii, GN
C2	LES, infecţii, diferite afecţiuni mediate imunologic, clinic sănătoşi
Calea alternativă	
C3	infecţii, GN
P	infecţii
D	infecţii
Calea efectoare terminală	
C5	infecţii (Neisseria), boala Leiner
C6	infecţii (Neisseria),
C7	infecţii (Neisseria), GN
C8	infecţii (Neisseria), Xeroderme, clinic sănătoşi
C9	infecţii (Neisseria), clinic sănătoşi
Inhibitori	
Cl-inhibitor	Edem angioneurotic
I	infecţii
H	Sindrom hemolitic uremic, clinic sănătoşi
Receptori pentru complement	
CRI	LES

LES: lupus eritematos sistemic
GN: glomerulonefrite

(Danazol 600 mg/zi, Stanazol, 30 mg/zi) care au efecte reduse masculinizante, dar induc sinteza proteică de C1-inhibitor la nivelul hepatic (81).

Deficitul homozigot de C4, recunoscut la peste 8 familii, este asociat cu LES. Deficitul heterozigot este însă greu de diagnosticat utilizînd determinarea nivelului circulant al C4 antigen deoarece există o mare varietate de forme alotipice, cu funcţionalitate redusă.

Deficitul homozigot de C2 a fost descris la peste 60 de familii, cel heterozigot la un număr mult mai mare. Peste 50% din indivizii cu deficit homozigot de C2 au LES sau sindroame „lupus-like"; majoritatea pacienţilor prezintă manifestări clinice tegumentare şi articulare dar mult mai puţin frecvent manifestări renale, fapt care ar putea fi explicat prin prevenirea instalării glomerulonefritei mediate de complexele imune în absenţa C2. Un număr mare al acestor pacienţi nu au anticorpi antinucleari sau, atunci cînd sînt prezenţi, ei prezintă titruri foarte scăzute, făcînd dificil diagnosticul de LES. Frecvenţa deficitului heterozigot de C2 (care este relativ uşor de stabilit) este de 6% între pacienţii cu LES, de 3% la pacienţii cu artrită reumatoidă juvenilă dar numai de 1% la pacienţii cu poliartrită reumatoidă. Din punct de vedere clinic nu au fost stabilite diferenţe între pacienţii cu LES cu sau fără deficit heterozigot, exceptînd tendinţa menţionată de a prezenta titruri mai scăzute sau absenţa anticorpilor antinucleari. Infecţiile nu sînt considerate o problemă majoră la familiile cu deficit de C2.

II.2.12. IMUNOGLOBULINELE

Imunoglobulinele (Ig) cuprind o grupă de glicoproteine larg răspîndite la vertebrate, distribuite în spațiile intra- și extravasculare precum și în secreții. Ig sînt dotate cu deosebite funcții în apărarea organismului, fiind direct implicate în: legarea specifică a antigenului (proteine străine organismului, „non-self"), activarea sistemului complement, promovarea răspunsului inflamator și modularea răspunsului imun prin interacțiunea cu receptorii celulelor imunoefectoare. Totodată, prin promovarea fagocitozei și prin blocarea antigenelor în complexe imune, se asigură îndepărtarea și distrucția acestor antigene prin fenomenul de clearence antigenic.

Asocierea activității anticorpilor cu fracțiunea gamaglobulinică obținută prin electroforeza serului a fost demonstrată încă din 1939 cînd Kabat, lucrînd în laboratoarele lui Tiselius, a observat că serul iepurilor hiperimunizați cu ovalbumină conține o fracțiune gamaglobulinică mult mai mare decît a iepurilor de control; atunci cînd serul hiperimun a fost amestecat cu ovalbumina (antigenul), a apărut un precipitat, iar electroforeza din supernatant a relevat o scădere semnificativă a fracțiunii gama. Concluziile lui Kabat și Tiselius se reflectă în utilizarea sinonimă a termenilor de gamaglobuline și imunoglobuline, chiar dacă unele din Ig sînt prezente și în alte fracțiuni electroforetice (55).

II.2.12.1. CLASIFICAREA ȘI STRUCTURA IMUNOGLOBULINELOR

Există descrise cinci clase de Ig: IgG, IgA, IgM, IgD și IgE, clasificarea lor fiind făcută în funcție de structura lor moleculară.

Porter și Edelman au elucidat bazele moleculare ale structurii Ig. Schematic, structura unei imunoglobuline prezintă, la un capăt, două situsuri de legare a antigenului, celălalt capăt al moleculei avînd alte funcții biologice ca: activarea complementului, atașarea la suprafața celulelor, pasajul transplacentar etc. (figura 2.15). Unitatea de bază a unei Ig are o greutate moleculară de 150.000 D și este compusă din patru lanțuri polipeptidice: 2 lanțuri identice „ușoare" (L) (GM; 22.000 D, 224 aminoacizi) și 2 lanțuri identice „grele" (H) (GM; 50.000—70.000 D, 446 aminoacizi) legate între ele prin punți disulfidice. Lanțurile ușoare sînt de două tipuri: kappa (k) și lambda (λ), prezente la toate clasele de imunoglobuline, fiecare moleculă de Ig posedînd fie 2 lanțuri k fie 2 lanțuri λ. Lanțurile grele sînt de 5 tipuri, corespunzînd celor 5 clase, fiind desemnate cu litere; γ, pentru IgG, α, (IgA), μ (IgM), δ, (IgD), ε (IgE).

Lanțurile grele sînt unice în structura unei clase, astfel că formula moleculară a IgG poate fi γ_2K_2 sau $\gamma_2\lambda_2$, a unei IgA α_2k_2, $\alpha_2\lambda_2$ etc. Cele două tipuri de lanțuri ușoare și cele cinci de lanțuri grele diferă între ele prin structura primară a aminoacizilor. Regiunea medie a moleculei este susceptibilă acțiunii enzimatice; papaina clivează molecula imediat la stînga legăturii disulfidice dintre lanțurile grele în 3 fragmente aproximativ egale; două dintre aceste fragmente poartă situsurile de combinare antigenice (Fab fragmente, „antigen binding") și al treilea fragment, care este cristalizabil, (Fc), are rol în interacțiunea cu sistemul complement și

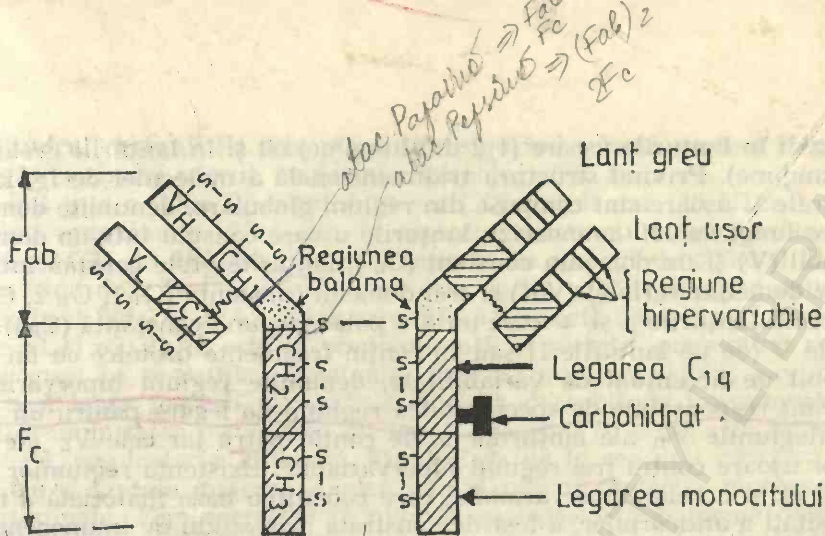


Fig. 2.15. Schema structurii unei imunoglobuline

în legarea de celule. Pepsina clivează molecula imediat la dreapta legăturii disulfhidrice dintre lanțurile grele, rezultînd un fragment mai mare, cu ambele situsuri de combinare $(Fab)_2$ și mai multe fragmente mici derivate din porțiunea Fc (figura 2.15, tabelul 2.9).

Atît lanțurile grele cît și cele ușoare posedă regiuni cu secvență a aminoacizilor variabilă (V) și constantă (C). Regiunile V au aceeași lun-

Tabelul 2.9

Principalele proprietăți fizico-chimice și biologice ale claselor de imunoglobuline

Clasa	Lanțul greu		Molecula întreagă $(H_2L_2)_n$					Concentrație serică		Transfer placentar	Activare complement
	GM	Domenii	GM	Coeficient sedimentare	n	Valența de legare a antigenelor	Carbohidrați (%)	mg/dl	UI/ml		
IgG γ	50000	4	150000	7S	1	2	3	1200 (800–1800)	150 (90–250)	+	+
IgA α	55000	4	300000	11S	2	4	7,5	200 (115–300)	145 (70–210)	–	–
IgM μ	70000	5	900000	19S	5	5	12	150 (60–230)	180 (75–290)	–	–
IgD δ	65000	4	180000	7S	1	2	12	0,3–30	1–200	–	–
IgE ε	65000	5	190000	8S	1	2	12	0,01–1	5–500	–	–

IgG : 100 UI/ml = 800 mg/dl
IgA : 100 UI/ml = 140 mg/dl
IgM : 100 UI/ml = 80 mg/dl

gime atît în lanțurile ușoare (1/2 din lungime) cît și în lanțurile grele (1/4 din lungime). Privind structura tridimensională a moleculei de Ig, lanțurile grele și ușoare sînt compuse din regiuni globulare, denumite domenii, fiecare lungi de 110 aminoacizi; lanțurile ușoare constau într-un domeniu variabil (V) și un domeniu constant (C_L); lanțurile grele constau într-un singur domeniu variabil (V_H) și trei domenii constante (C_H1, C_H2, C_H3), exceptînd lanțurile μ și ε care au o a patra regiune constantă (C_H4). Regiunile V (de pe lanțurile H sau L) conțin fragmente proteice cu un grad deosebit de accentuat de variabilitate, denumite regiuni hipervariabile, care sînt responsabile de specificitatea regiunii de legare pentru un antigen. Regiunile V_H ale lanțurilor grele conțin patru iar cele V_L ale lanțurilor ușoare conțin trei regiuni hipervariabile. Existența regiunilor constante ca și a celor hipervariabile, care constituie baza materială a marii diversități a anticorpilor, a fost demonstrată prin studii de imunogenetică. Astfel Dreyer și Bennett, contrar considerației axiomatice a biologiei moleculare „o genă — o proteină", propun teoria sintezei codificate separat a diferitelor regiuni C și V din molecula Ig. Genele separate pe trei cromozomi diferiți se apropie prin recombinare în cursul maturării limfocitului B, constituind trei grupe separate de codificare; grupul k pentru sinteza lanțului ușor k; (V_k și C_k); grupul ($V\lambda$ și $C\lambda$) și un grup de sinteză a lanțului greu (V_H.$C\gamma$, $C\mu$, $C\alpha$, $C\delta$, $C\varepsilon$). Deși în cursul transcripției și translației genetice cele trei grupe de gene nu își amestecă informația, există posibilitatea așa-numitei „mutații somatice", constînd în combinații genetice ale regiunilor codificînd zonele hipervariabile, combinații care, în peste 1200 variante pentru fiecare lanț ușor, asigură marea variabilitate a populației de imunoglobuline și posibilitatea acestora de a se adapta combinativ cu o mare varietate de antigene (55).

IgG sînt sintetizate de plasmocitele din măduva hematoformatoare. În timp ce IgE și IgD sînt, în mare majoritate, aderente la suprafața unor celule imune efectoare, IgG, IgA și IgM sînt doar în mică măsură legate de celule, majoritatea fiind distribuite liber în spațiile intra- și extravasculare sau în secreții. Timpul de înjumătățire în circulație, specific fiecărei clase și dependent de concentrație, este în medie de 20 de zile pentru IgG, 6 zile pentru IgA și 5 zile pentru IgM iar 2 zile pentru IgE. Metabolizarea lor este puțin cunoscută, unele clase (IgG, IgD) avînd o marcată susceptibilitate la acțiunea proteolitică a unor enzime. Majoritatea Ig sînt preluate prin pinocitoză în celulele endoteliale și cele fagocitare unde sînt degradate enzimatic. Lanțurile ușoare ale IgG sînt mai degrabă filtrate la nivel glomerular avînd o scurtă perioadă de înjumătățire în circulație (59).

IgG este cea mai comună și mai răspîndită clasă de Ig, cuprinzînd 75% din cele serice (valoare medie 1200 mg/dl adică 150 UI/ml). Sînt descrise 4 subclase ale IgG umane diferind prin structura primară a aminoacizilor lanțului greu (γ_1—γ_4); IgG 1, IgG2, IgG3, IgG_4. IgG are o funcție importantă de blocare a antigenelor, opsonizare, funcție antitoxică și antivirală. Complexată cu antigenul, interacționează cu receptorul Fc al neutrofilului. Activează calea clasică a sistemului complement, prin interacțiunea a două molecule de IgG cu antigenul, complexul, la rîndul său, interacționînd cu fragmentul Clq prin regiunea C_H2 a Ig. Una din proprietățile cele mai importante ale IgG umane este posibilitatea de a trece

cu ajutorul regiunii Fc prin placentă, asigurînd o bună parte a imunității umorale a noului născut, cu funcția imunologică în formare.

IgA este a doua Ig comună în ser (200 mg/dl sau 145 UI/ml), reprezentînd aproximativ 13% din Ig serice; are structura asemănătoare cu a IgG și GM de 150.000 D sau dimerizată în secreții de 300.000 D, diferența fiind doar în lanțul greu care este de tip α. Sînt descrise două subclase; IgA1 80% și IgA2 20%, care diferă prin cele două tipuri de lanțuri grele $\alpha 1$ și $\alpha 2$; IgA2 este Ig predominantă în secreții, prezentînd concentrații mari în secrețiile intestinale, nazale, bronșice, salivă, lacrimi, colostru și lapte matern, de unde și funcția deosebit de importantă de a asigura imunitatea locală față de agenți patogeni cu poartă de intrare intestinală, respiratorie, cutanată. Fiind clasa de Ig cea mai concentrată în colostru și laptele matern, asigură noului născut protecția mucoasei gastrointestinale. Este secretată la nivelul mucoaselor sub formă de dimer, două unități a patru lanțuri, legate între ele printr-un lanț peptidic J și avînd atașate o piesă glicopeptidică — component secretor — care îi facilitează excreția și asigură protecția față de agenții proteolitici (55).

IgM reprezintă 7% din totalul Ig circulante (150 mg/dl sau 180 UI/ml), cu toate acestea are un rol deosebit de important în medierea răspunsului imun. Este o moleculă cu GM mare (900.000 D), fiind compusă din cinci unități de bază imunoglobulinice, unitățile fiind legate printr-o piesă J polipeptidică de legătură. Molecula posedă 10 situsuri de combinare cu antigenul deși, în general, sînt folosite maximum cinci dintre ele pentru a lega puternic antigene mari, cu determinanți identici, repetitivi, ca pereții bacterieni, capside virale, fimbrii sau alte suprafețe celulare. IgM este clasa de Ig cea mai eficientă în activarea complementului și medierea lizei celulare; o singură moleculă de IgM este suficientă pentru ca, atașată la suprafața celulară, să medieze liza prin activarea complementului. Este suficientă de asemenea în aglutinarea și opsonizarea bacteriană, dar pentru ca procesele de mai sus să fie eficiente necesită activarea sistemului complement, cu legarea fragmentului C3 în complexul imun, devenind astfel posibilă fagocitarea acestor complexe de către neutrofile. IgM este produs înaintea IgG, în cadrul răspunsului imun, și alături de sistemul complement, sînt foarte eficiente în medierea răspunsului primar antimicrobian. Este și prima Ig sintetizată de făt; deși nu trece transplacentar, fătul o poate produce în condițiile unei stimulări antigenice corespunzătoare. Alte exemple de anticorpi din clasa IgM sînt aglutininele izogrup sanguin AB0, anticorpii antigenului 0 al enterobacteriaceelor precum și factorul reumatoid, decelat în serul bolnavilor cu poliartrită reumatoidă.

IgD este prezentă în ser în concentrații mici (3 mg/dl) din care peste 50% sînt atașate la suprafața membranei limfocitului B ca receptor pentru antigen. IgD libere provin fie din desfacerea celor aderente la suprafața celulară, fie prin sinteză de către un număr redus de plasmocite (tabelul 2.9).

IgE, deși se găsește în cantități mici în circulație (sub 1mg/dl) și nu are implicare în funcția de apărare a organismului este totuși importantă în medierea reacțiilor de hipersensibilitate și anafilaxie. Aderînd la suprafața mastocitului și bazofilului prin intermediul Fc, la combinarea cu antigenul (alergene; praf, polen etc.) produce degranularea și elibera-

rea în mediu a histaminei și a altor mediatori ai inflamației acute, generînd tabloul clinic al hipersensibilității imediate. Totuși acest tip de mediere a răspunsului inflamator are valoare protectivă în infestația cu helminți. IgE sînt termolabile, fiind distruse prin încălzire la 56°C, 30 min.

Pentru a putea înțelege în profunzime genetica și evoluția Ig precum și reglarea sintezei acestora a fost propusă teoria „rețelei" de către Jerne și colaboratorii. Se denumește astfel idiotip o structură antigenică (lanț polipeptidic specific) exprimată în regiunea variabilă (V_H, V_L) a imunoglobulinelor, în molecula receptorilor celulelor T și B și în molecula factorilor reglatori secretați de celula T. A fost demonstrat experimental că reglarea răspunsului imun se bazează pe interacțiunea unei „rețele" de idiotipi complementari care se recunosc unii de către alții, astfel încît relația idiotip — antiidiotip poate conduce la accentuarea sau supresia răspunsului imun, prin acțiunea reglatoare asupra subseturilor de limfocite T (T-helper și T-supresor), fiecare din aceste celule avînd exprimați la suprafață unul sau mai mulți idiotipi. Astfel răspunsul imun, fiind la o cotă înaltă a echilibrului dinamic, poate fi modulat prin interacțiunea în circuit a rețelei: celulă-idiotip-antigen.

II.2.12.2. IMUNODEFICITELE PRIMARE

Imunodeficitele primare pot fi analizate și înțelese numai după o bună cunoaștere a dezvoltării normale și a funcțiilor celulelor sistemului imun. Principalele două tipuri de celule implicate în răspunsul imun sînt limfocitele T și B. Ele sînt generate în medii diferite, se dezvoltă ca linii separate, exprimă la suprafață receptori pentru antigene variate, dar acționează împreună pentru a discrimina între self și non-self, respectiv între ceea ce aparține organismului și ceea ce îi este străin.

Obținerea de anticorpi monoclonali a permis o mai bună caracterizare și identificare a limfocitelor T și B pe baza unor antigene de suprafață specifice. Primii astfel de anticorpi monoclonali au fost produși la firma Ortho în 1979, fiind obținuți de un grup de cercetare condus de *Kung*, de unde au primit și denumirea *O K* T, ei caracterizînd glicoproteinele de suprafață a celulelor T. Ulterior, multe firme au început să producă anticorpi monoclonali, fiecare fiind denumiți diferit, deși mulți din ei erau specifici acelorași antigene. În urma unei conferințe OMS s-a convenit ca antigenele de suprafață să fie denumite în funcție de anticorpul monoclonal specific unui antigen celular, denumit cu termenul CD (cluster of differention). În tabelul 2.10 sînt redate o parte din cele 78 de antigene din sistemul CD, precum și celulele pe care sînt prezente.

Celulele stem (matcă) duc la formarea de celule B în țesuturile hematoformatoare. Într-un prim stadiu de diferențiere se formează celule pro-B mari, ce conțin, în citoplasmă, lanțuri μ. Prin diviziunea acestor celule se ajunge la formarea de celule pro-B mici, conținînd de asemenea

Tabelul 2.10

O parte din antigenele leucocitare de suprafaţă definite prin nomenclatura CD

Nume	Alte nume	Greutate moleculară (KD)	Distribuţie celulară
CD 1	T6	49	Timocite corticale, celule Langhans
CD 2	T11	50	Celule T
CD 3*	T3	29	Celule T
CD 4*	T4	55	Celule T helper, inductoare, macrofage
CD 5	T1	67	Celule T
CD 7	FcμR	40	Celule T
CD 8*	T 8	33	Celule T supresoare/citotoxice
CD 10	CALLA	100	Celule B imature
CD 11a	LFA 1	180	Leucocite
CD 11b	Mac 1/CR 3	170	Granulocite, monocite
CD 11c	p 150,95	150	Monofage, granulocite
CD 14*		55	Monocite celule Kupffer, granulocite celule dendritice
CD 15		50–180	Granulocite, celule Reed-Sternberg
CD 16*	Fc RIII	50–60	Granulocite, macrofage
CD 19*	Bp 95, B4	95	Celule B
CD 20*	Bp 131,B1	35	Celule B
CD 21	CR2	140	Celule B
CD 22	Bp 135	135	Celule B mature, celule B imature
CD 25	Tac	55	Celule active, macrofage
CD 33		67	Celule precursoare ale liniei mieloide
CD 35	CR 11	220	Celule dendritice, celule B, eritrocite, granulocite
CD 38	T 10	45	Celulele centrului germinal, plasmocite, celule T
CD 45	LCA	180–220	Majoritatea celulelor seriei albe

* Cei mai importanţi markeri utilizaţi în numărarea subseturilor de celule ale seriei albe din sîngele periferic.

lanţuri μ intracitoplasmatice (figura 2.16). Astfel de celule pro-B se transformă în celule B imature, mici, care sintetizează şi lanţuri k sau λ, exprimînd la suprafaţă molecule de IgM. După cîteva zile de evoluţie, majoritatea celulelor B exprimă şi IgD la suprafaţă devenind celule B mature. În cadrul fiecărei clone, unele componente se comută şi exprimă la suprafaţă IgG1, IgG2, IgG3 sau IgG4, IgA1 sau IgA2, sau IgE (73). La scurt timp după formarea lor în ficatul fetal sau măduvă, celulele B intră în circulaţie şi migrează pentru a forma foliculii limfatici, în special în splină şi ganglioni limfatici, plăci Peyer şi alte ţesuturi limfoide (64). În cursul vieţii, milioane de celule B sînt generate în fiecare zi în măduva hematoformatoare, dar trăiesc probabil numai cîteva zile după ce ajung în splină. Pe parcursul diferenţierii celulelor B, apar la suprafaţa lor diverşi receptori cum sînt: receptorii pentru regiunea Fc a IgG şi pentru alţi determinanţi izotipici ai imunoglobulinelor, receptori pentru virusul Epstein-Barr, receptori pentru componentele de complement C3b şi C3d, receptori pentru factorii de creştere şi diferenţiere produşi de celulele T.

celulă pro-B
TdT
HLA-DR
CD34
CD19
CD22
(CD9)

celulă pre-pre-B
TdT
HLA-DR
CD34
CD19
CD22
(CD9)
CD10
(CD20)

celulă pre-B
TdT
HLA-DR
(CD34)
CD19
CD22
CD9
CD10
(CD20)
Cyμ

celulă tînără B
HLA-DR
CD19
CD22
(CD9)
(CD10)
CD20
(CD21)
Y29/55
SmIg

celulă intermediară B
HLA-DR
CD19
CD22
(CD9)
CD20
CD21
Y29/55
SmIg
(CD6)

celulă matură B
HLA-DR
CD19
CD22
CD20
(CD21)
Y29/55
FMC7
SmIg

imunoblast
HLA-DR
CD19
CD22
CD20
Y29/55
FMC7
SmIg
(CyIg)

imunocit
HLA-DR
CD19
CD22
(CD20)
(Y29/55)
SmIg
CyIg

plasmocit
(HLA-DR)
CD38
PCA-1
CyIg

celulă stem limfoidă
TdT
HLA-DR
CD34

LIMFOIDĂ

protimocit
TdT
HLA-DR
CD34
CD7
CD2
(CyCD3)

timocit imatur
TdT
CD7
CD2
CyCD3
CD5

timocit comun
TdT
CD7
CD2
CyCD3
CD5
CD1
CD4,CD8
(TcR-CD3)
(CD10)

timocit matur
(TdT)
CD7
CD2
(CyCD3)
CD5
CD4
TcR-CD3

limfocit T helper/inductor
CD7
CD2
CD5
CD4
TcR-CD3

limfocit T helper/inductor activat
CD7
CD2
CD5
CD4
TcR-CD3
HLA-DR
CD26

timocit matur
(TdT)
CD7
CD2
(CyCD3)
CD6
CD8
TcR-CD3

limfocit T supresor/citotoxic
CD7
CD2
CD6
CD8
TcA-CD3
(CD16)

limfocit T supresor/citotoxic activat
CD7
CD2
CD5
CD8
TcR-CD3
HLA-DR
CD25

Fig. 2.16. Reprezentarea schematică a diferenţierii celulelor seriei limfoide, cu indicarea markerilor celulari de suprafaţă în diferitele stadii de diferenţiere. Markerii din paranteză nu sînt prezenţi întotdeauna. Caracteristicile markerilor de suprafaţă din sistemul CD sînt redate în tabelul 2.10. Legenda: Y29/25 = antigen al celulei B, = MC7-antigen al celulei B; zwakCyμ = exprimare citoplasmatică slabă de lanţ greuμ al IgG; SmIg = exprimare la suprafaţa a Ig; CyIg — exprimare citoplasmatică a Ig; PCA-1-antigen al plasmocitelor; Tdt = deoxinucleotidil transferaza terminală; TCR = receptorul celulei T; HLA-Dr = antigen clasa II MHC

În urma interacţiunii moleculelor anticorpilor de suprafaţă cu antigenul, sau sub acţiunea celulelor T-helper, celulele B cresc în mărime, proliferează şi se diferenţiază în plasmocite. Acestea au capacitatea de a produce şi secreta mii de molecule de anticorpi identice pe secundă. Plasmocitele se divid rar şi trăiesc numai cîteva zile. Unele celule B activate nu se diferenţiază în plasmocite, ci servesc ca celule B cu memorie, fiind uşor activabile de către antigene (73).

Imunodeficitele primare pot fi astfel clasificate în:

a. Imunodeficite în care predomină tulburări ale producţiei de anticorpi;
b. Imunodeficite în care predomină tulburări ale imunităţii celulare (tabelul 2.11).

Tabelul 2.11

Clasificarea imunodeficitelor primare

A. *Imunodeficite în care predomină tulburări în producerea anticorpilor*

— Agamaglobulinemia legată de cromozomul X
— Agamaglobulinemia autosomal recesivă
— Deficitul de imunoglobuline cu IgM crescut (şi IgD)
— Deficitul de IgA
— Deficitul de anticorpi cu nivele normale de gamaglobuline sau cu hipergamaglobulinemie
— Imunodeficitul cu timom
— Hipogamaglobulinemia tranzitorie a noului născut
— Imunodeficitul variabil comun
 a. cu tulburări predominante ale celulei B
 b. cu tulburări predominante ale celulei T
 c. cu autoanticorpi faţă de celulele B şi T

B. *Imunodeficite în care predomină tulburări ale imunităţii mediate celular*

— Imunodeficitul combinat cu predominanţa tulburărilor celulei T
— Deficitul de purin-nucleozid fosforilază
— Imunodeficitul combinat sever cu deficit de adenozin-dezaminaza
— Imunodeficitul combinat sever
 a. disgenezia reticulară
 b. cu număr scăzut de limfocite T şi B
 c. cu număr scăzut de limfocite T şi limfocite B normale (Swiss)
 d. sindromul limfocitelor „golaşe"

C. *Imunodeficite asociate cu alte tulburări*

— Deficitul de transcobalamina II
— Sindromul Wiskott-Aldrich
— Ataxia-teleangiectazia
— Sindromul DiGeorge

II.2.12.2.1. *IMUNODEFICITELE ÎN CARE PREDOMINĂ TULBURĂRI ÎN PRODUCEREA DE ANTICORPI*

Agamaglobulinemia legată de cromozomul X, a fost descrisă în urmă cu aproximativ 30 de ani şi rămîne prototipul imunodeficitelor primare umorale. S-a mai denumit şi agamaglobulinemie Bruton. Se caracterizează prin infecţii recurente, piogene, ce debutează în primii ani de viaţă sau în copilărie, în absenţa tuturor claselor de Ig din ser şi incapacitatea de a produce anticorpi chiar atunci cînd se face stimulare cu un antigen puternic. În ţesuturile limfoide lipsesc plasmocitele. Sînt afectaţi numai copii de sex masculin, la aproximativ 20% din ei fiind afectate şi rudele de sex masculin ale mamei. Defectul care duce la agamaglobulinemia legată de sex este la nivelul celulelor B şi reflectă o blocare a maturării celulelor pro-B în celula B. Numărul celulelor pro-B în măduva hematoformatoare este normal (73). Studiile lanţului greu μ intracitoplasmatic, la astfel de bolnavi, arată că acesta este incomplet, lipsindu-i proteinele codificate de gena regiunii variabile (V). Imunitatea mediată celular este normală, atît ca număr de celule cît şi ca funcţie.

Alături de infecţiile piogene s-au descris, în astfel de cazuri, şi infecţii persistente virale precum şi infecţii cu paraziţi şi micoplasme. Te-

rapia acestui tip de agamaglobulinemie constă în administrarea de gamaglobuline intramuscular sau intravenos sau infuzii de plasmă. Administrarea de gamaglobuline duce la reducerea frecvenței infecțiilor acute și poate chiar conduce la îndepărtarea infecțiilor virale cronice. Doza și frecvența administrării sînt încă insuficient de bine stabilite. Se recomandă, în general, o doză de 100 mg/kg corp/lună astfel încît, în majoritatea cazurilor, se ajunge, după aproximativ trei luni, la o echilibrare a nivelului seric. Cele două căi de administrare sînt la fel de eficiente. La adulți, îndeosebi cînd trebuie administrate cantități mai mari, pentru a se ajunge la un nivel seric adecvat al IgG, este de preferat administrarea intravenoasă.

S-a descris și o familie la care agamaglobulinemia legată de cromozomul X se asociază cu un deficit al hormonului de creștere. Și în acest caz, agamaglobulinemia era dată de un defect de maturare a celulelor B din stadiul pro-B în stadiul de celule B. Nu există o explicație satisfăcătoare a asocierii celor două deficite.

Agamaglobulinemia autosomal recesivă este o boală care apare și la femei, fiind similară cu cea legată de cromozomul X de la bărbați. Se caracterizează prin absența tuturor claselor de imunoglobuline, incapacitatea de a produce anticorpi la stimularea antigenică, absența plasmocitelor și limfocitelor B circulante, funcție intactă a limfocitelor T. Apare la femei încă din copilărie, iar deficite imunologice pot fi evidențiate și la alți membri ai familiei. Defectul ce caracterizează boala este unul intrinsec, al precursorilor celulelor B diferențiate.

Deficitul de imunoglobuline cu IgM crescute (și IgD). Sindromul se caracterizează prin infecții piogene severe (septicemii, pneumonii, otite), anemii hemolitice, trombocitopenii și boli limfoproliferative, însoțite de valori normale sau crescute ale IgM serice (uneori cu IgD crescut) și absența IgG și IgA. Imunitatea celulară este nemodificată. Stimularea limfocitelor B duce la o sinteză crescută de IgM și IgD, fără să se sintetizeze IgG și IgA. În ontogenia celulei B, IgM se exprimă la suprafața celulei înaintea celorlalte clase de Ig. Se presupune că defectul se datorește lipsei de maturare a celulelor B-IgM spre celule IgG^+, IgA^+ și IgE^+.

Deficitul selectiv de IgA. Absența sau scăderea marcată a IgA (sub 0,05 mg/ml) are o frecvență de 1/500 în populația generală. O parte din persoanele cu deficit de IgA au fost identificate printre donatorii de sînge care erau sănătoși din punct de vedere clinic. Deficitul de IgA se asociază frecvent și cu o serie de boli autoimune (LES, poliartrita reumatoidă, anemie hemolitică, sindrom Sjögren) și bineînțeles cu infecții recurente respiratorii, gastrointestinale și alergii. La acești pacienți, există o formă particulară de alergie constînd în apariția de titruri înalte de anticorpi anti-IgA și reacții anafilactice la administrarea de plasmă. Incidența anticorpilor anti-IgA este mult mai mare decît cea a reacțiilor anafilactice. Unii pacienți prezintă anticorpi anti- IgA fără să fi avut în antecedente administrări de plasmă sau de gamaglobuline.

Recent s-a demonstrat asocierea deficitului de IgA cu deficitul de subclase de IgG, mai ales IgG2 și IgG4. Aceste modificări ale subclaselor de IgG nu se însoțesc de modificări ale nivelului seric al IgG total, iar gamaglobulinele nu sînt scăzute la electroforeza proteinelor serice.

Deficitul în subclase de IgG se asociază cu creșterea susceptibilității la infecții și boli limfoproliferative. De asemenea, aproximativ 1/2 din pacienții cu deficit de IgA au și nivele serice scăzute ale IgE. S-ar părea deci că, mai ales la pacienții simptomatici, aceste deficite asociate reflectă o tulburare mai generală în diferențierea terminală a celulei B. De aceea nivelele serice scăzute sau absența IgA nu sînt suficiente pentru diagnosticul deficitului selectiv de IgA. Pacienții simptomatici cu nivele scăzute de IgA necesită determinări ale subclaselor de IgG, a IgA din secreții, a componentului secretor și a funcției limfocitelor T și B. Pacienții cu deficit asociat de subclase de IgG pot beneficia de terapie cu gamaglobuline.

Deficitul selectiv al altor clase de imunoglobuline. Cel mai cunoscut deficit este cel de IgM, care se asociază cu meningococemie și alte tipuri de infecții recurente și deficitul de IgE care apare la indivizi clinic sănătoși. Există și posibilitatea ca, în unele cazuri, nivelele IgE să fie normale sau chiar crescute dar răspunsul în producția de anticorpi la o serie de antigene să fie necorespunzător, ducînd la apariția de infecții recurente.

Hipogamaglobulinemia tranzitorie a noului născut apare, în general, între 3 și 6 luni de la naștere și se referă, în principal, la IgG, mai rar la IgA și IgM. Hipogamaglobulinemia apare ca urmare a faptului că IgG din serul nou-născutului, provenite de la mamă, sînt catabolizate, iar sinteza propriilor Ig îndeosebi a IgG nu a început încă. Acest deficit se rezolvă spontan, nefiind necesară administrarea de gamaglobuline decît în cazul unor infecții recurente severe și a unei hipogamaglobulinemii marcate.

Imunodeficitul variabil comun. Acest tip de imunodeficit apare la orice vîrstă, atît la femei cît și la bărbați. Sindromul clinic este similar cu cel din agamaglobinemia legată de cromozomul X și se asociază cu o mare incidență a LES, anemiei hemolitice, purpurei trombocitopenice idiopatice, infecțiilor pulmonare, tulburărilor digestive cu diaree marcată, în special datorită prezenței Giardiei lamblia. Tumorile cu localizare digestivă sînt de asemenea întîlnite relativ frecvent; la o treime din pacienți se întîlnește anemia Biermer și, în unele cazuri, granuloame la nivelul plămînului, ficatului și pielii. Mecanismele care duc la imunodeficitul variabil comun sînt trei:

a. Defecte intrinseci ale celulei B;

b. Autoanticorpi față de celulele T și B;

c. Dezechilibrul celulelor T imunoreglatoare;

Spre deosebire de agamaglobulinemia legată de cromozomul X, celulele B nu sînt întotdeauna scăzute, ele putînd fi normale sau crescute. Aceste celule însă sînt relativ imature și nu răspund la antigene și mitogeni prin diferențiere în plasmocite. La toate grupurile de pacienți, raportul limfocite T-helper/T-supresor este inversat, excesul de limfocite T-supresoare împiedicînd diferențierea celulelor B. Cel mai frecvent, cele trei clase majore de imunoglobuline sînt extrem de scăzute, iar nivelul IgE este normal sau chiar crescut.

Sindromul de hiperimunoglobulinemie E (Sindromul Job) este o boală complexă care se caracterizează prin debut în copilărie, concentrații foarte crescute de IgE și infecții bacteriene recurente, îndeosebi cu stafilococ, tegumentare și pleuropulmonare. La nivelul pielii apar ab-

cese subcutanate determinate de stafilococul aureu hemolitic. În cadrul acestui sindrom, alte sedii de localizare a infecţiei sînt reprezentate de urechea medie şi externă, mastoidă, gingii, bronşii şi plămîni. Mai pot apare dermatite cronice şi candidoză mucocutanată. În afară de IgE mult crescut s-a mai descris o eozinofilie moderată, nivele crescute ale IgD şi deficite ale funcţiei neutrofilelor, celulelor T supresoare şi a răspunsului anamnestic la diferite antigene. Aceste anomalii nu explică decît parţial susceptibiltatea crescută la infecţii a acestor pacienţi. Nu există tratament specific, fiind tratate doar infecţiile cu antibiotice adecvate (25).

II.2.12.2.2. *IMUNODEFICITE ÎN CARE PREDOMINĂ TULBURĂRI ALE IMUNITĂŢII CELULARE*

Descrierea unor astfel de anomalii depăşeşte cadrul acestui capitol profilat pe proteine plasmatice. Principalele deficite ale imunităţii celulare sînt redate în tabelul 2.11. Nivele scăzute ale Ig se întîlnesc şi în unele cazuri de deficite ale imunităţii celulare. Astfel, în imunodeficitul sever combinat, care se caracterizează prin lipsa limfocitelor T cu nivele scăzute sau normale ale limfocitelor B, care însă nu se diferenţiază în plasmocite, Ig sînt mult scăzute. Cauza lipsei de diferenţiere spre plasmocite a limfocitelor B este lipsa limfocitelor T helper. Dintre deficitele dobîndite se întîlneşte frecvent sindromul de imunodeficienţă dobîndit (AIDS sau SIDA în prescurtări internaţionale), sindrom determinat de infecţia cu un virus denumit virusul imunodeficienţei umane tip 1 sau 2 (HIV 1 şi 2). Acest virus este limfotropic şi are capacitatea ca, prin intermediul unei glicoproteine de suprafaţă, gpl 20, să se fixeze de antigenul CD4 de la suprafaţa limfocitelor helper, să pătrundă în interiorul lor şi să le distrugă. Din punct de vedere clinic, sindromul se caracterizează prin astenie, slăbire în greutate, subfebrilităţi, poliadenopatie, diaree cronică, infecţii cu germeni oportunişti. Paraclinic, se constată limfopenie, cu scăderea marcată a limfocitelor T helper, hipergamaglobulinemie, creşterea valorilor β_2 microglobulinei, apariţia de complexe imune circulante şi, bineînţeles, apariţia de anticorpi anti-HIV (detectaţi prin tehnici ELISA sau Western blotting).

II.2.12.3. GAMOPATIILE MONOCLONALE

Gamopatiile monoclonale sînt boli caracterizate prin prezenţa în ser sau urină de imunoglobuline monoclonale denumite şi paraproteine sau componentă M (monoclonală). Această componentă monoclonală este produsă de o singură clonă de celule limfoide, are o mobilitate electroforetică limitată, apărînd la electroforeza proteinelor serice ca o bandă îngustă „în pisc" (21). Clasificarea gamopatiilor monoclonale este redată în tabelul 2.12. Proteinele monoclonale sînt imunoglobuline normale ca şi structură, fiind produse însă în exces (72). Numai în unele cazuri de boală a lanţurilor grele s-au semnalat deleţii de aminoacizi, fiind vorba, în aceste cazuri, de imunoglobuline anormale. Din punct de vedere funcţional, astfel de imunoglobuline prezintă, în unele cazuri, şi activitate de anticorpi faţă de o serie de antigene bacteriene. Totuşi mielomul multiplu este considerat, în general, ca o stare de imunodeficienţă avînd în vedere reducerea secreţiei altor clase de imunoglobuline paralel cu creşterea excesivă a paraproteinei şi susceptibilitatea crescută la infecţii.

Tabelul 2.12

Clasificarea gamopatiilor monoclonale

A. *Gamopatii monoclonale maligne*

— Mielomul multiplu (IgG, IgA, IgD, IgE şi cu lanţuri uşoare libere)
— Plasmocitomul solitar
— Plasmocitomul extramedular, solitar sau multiplu
— Macroglobulinemia Waldenström (IgM)
— Boala lanţurilor grele (γ, α, μ, δ)
— Amiloidoza primară şi asociată mielomului multiplu

B. *Gamopatii monoclonale benigne* (IgG, IgA, IgD, IgM, şi rar lanţuri uşoare libere)

C. *Gamopatii biclonale*

În mod fiziologic, plasmocitele produc lanţuri grele şi lanţuri uşoare în exces faţă de lanţurile grele. În cazul mielomului IgG, 75% din pacienţi prezintă un exces de lanţuri uşoare care se excretă în urină determinînd apariţia proteinuriei de tip Bence Jones. În alte cazuri, nu se produc deloc lanţuri grele, detectîndu-se doar prezenţa de lanţuri uşoare în exces (boala lanţurilor uşoare). Există şi cazuri rare în care celule mielomatoase nu secretă nici lanţuri uşoare, nici lanţuri grele, datorită fie incapacităţii de sinteză, fie blocării secreţiei, aceste celule fiind nesecretoare; se vorbeşte în aceste cazuri de mielom nesecretor. În boala lanţurilor grele, porţiuni ale lanţurilor grele ale IgG, IgA, IgM sau IgD sînt prezente în ser sau urină iar lanţurile uşoare lipsesc.

II.2.12.3.1. *MIELOMUL MULTIPLU*

Mielomul multiplu apare, în general, la vîrstnici cu o incidenţă anuală de 3 la 100.000 indivizi. Studiul evoluţiei naturale a bolii arată că aceasta devine manifest clinic atunci cînd se ajunge la 1×10^{11} — 1×10^{12} plasmocite maligne, ceea ce reprezintă aproximativ 1 kg masă tumorală. Perioada latentă a bolii este, în general, de 1—2 ani. Proliferarea plasmocitelor are loc la nivelul măduvei hematoformatoare, în mod difuz, astfel că tumoarea nu este vizibilă sau palpabilă. Plasmocitele proliferate au caractere morfologice modificate, sînt în cantitate mare, depăşind 7% din totalul elementelor nucleate şi sînt dispuse focal (în cuiburi). Din punct de vedere clinic, primele semne sînt reprezentate de astenie, anemie şi anorexie (21, 58). Anemia apare cel mai frecvent şi se datorează infiltrării măduvei roşii cu plasmocite, pierderilor de sînge, malnutriţiei şi, implicit, deficitului de Fe. Semnul cel mai clasic al bolii este reprezentat de leziunile osoase, care apar la majoritatea pacienţilor. În mod caracteristic, leziunile sînt osteolitice, fără semne de refacere a ţesutului osos distrus şi pot duce la apariţia de fracturi spontane. Aceste modificări se datoresc înlocuirii ţesutului osos cu celule neoplazice proliferate precum şi producerii unui factor activator al osteoclastelor de către plasmocite. Localizarea este predominantă la nivelul craniului, sternului, claviculelor şi oaselor bazinului. Aceste leziuni sînt evidenţiabile radiologic. La 1/3 din cazuri, sînt pre-

zente numai zone de demineralizare, fără distrucţie focală, sau chiar aspect normal (78, 89).

O altă caracteristică importantă este prezenţa de infecţii recurente, mai frecvent pulmonare şi mai rar unele renale determinate de imunodeficitul ce se instalează concomitent cu proliferarea unei singure clone de plasmocite şi inhibarea celorlalte clone prin intermediul paraproteinei produse în exces. De asemenea, producerea în exces de imunoglobuline monoclonale se asociază cu tulburări ale funcţiei neutrofilelor precum şi a celulelor T şi B.

Producerea de lanţuri uşoare în exces duce la apariţia acestora în urină, realizînd proteinuria de tip Bence Jones (49, 84). Deoarece lanţurile uşoare ale Ig sînt catabolizate la nivelul epiteliului tubilor renali proximali, încărcarea acestora cu cantităţi mari de lanţuri uşoare, asociată cu tulburări determinate de hipervîscozitate şi de anomalii circulatorii duce cu timpul la afectarea renală, ce poate evolua pînă la insuficienţa renală. Pacienţii cu mielom multiplu mai prezintă: sîngerări şi tulburări de coagulare, anemii hemolitice şi, extrem de rar, hiperlipoproteinemii autoimune (vezi pag. 50)

Testele de laborator arată existenţa unui VSH mult accelerat, prezenţa anemiei, eventual a hipercalcemiei în raport de extinderea leziunilor osoase, a hiperproteinemiei (în unele cazuri peste 10 g/dl), prezenţa de crioglobuline, a hipervîscozităţii, a apariţiei de hematii în fişicuri în pipeta Potain sau pe lamă.

Un rol important pentru diagnostic îl are efectuarea puncţiei medulare care arată o creştere a numărului de plasmocite peste 7%. La electroforeza serului se observă apariţia unei benzi înguste monoclonale cu mobilitate, variind de la regiunea gama pînă la alfa 2. Aceasta este determinată de clasa de imunoglobuline care proliferează. Aproximativ 80% din mieloame au prezentă paraproteina în ser. În urină apar în 20—60% din cazuri lanţuri uşoare ale imunoglobulinelor, astfel că 98—99% din cazurile de mielon multiplu au prezentat o paraproteină în ser şi/sau urină (84) (figurile 2.17, 2.18). Dacă se suspicionează prezenţa unei imunoglobuline monoclonale, se recomandă următoarele etape de studiu al paraproteinei:

— Electroforeza serului şi a urinii concentrate; dacă se identifică prezenţa unei paraproteine se continuă cu etapa următoare;

— Determinarea cantitativă a IgG, IgA, IgM;

— Imunoelectroforeza serului şi a urinii concentrate utilizînd antiseruri specifice anti-IgG, IgA, IgM, lanţuri uşoare k şi λ;

— Dacă aceste teste sînt negative, se recomandă determinarea IgD şi IgE.

La determinarea cantitativă a imunoglobulinelor, aspectul caracteristic este cu creşterea accentuată a unei clase de Ig şi valori scăzute ale celorlalte clase. Aspectul imunoelectroforetic este caracteristic, constînd într-un arc de precipitare anormal, mult îngroşat şi deformat „în barcă", diferenţiind o creştere monoclonală de una policlonală a Ig. Se consideră, în general, că 80% din mieloame sînt de tip IgG, 15% de tip IgA şi foarte puţine de tip, IgD şi IgE (1%). Sînt cazuri în care, componenta monoclonală nu se evidenţiază în ser. Aşa se întîmplă mai ales în mielomul multiplu în care celulele tumorale secretă numai lan-

ţuri uşoare. Acestea sînt însă prezente în urină cu mobilitate variind de la γ la α_1, şi identificabile prin imunoelectroforeză cu antiseruri specifice pentru lanţuri k şi λ. De asemenea, paraproteina din mielomul IgD se evidenţiază numai la 1/3 din cazuri. Întrucît paraproteina IgD conţine, de regulă, lanţurile uşoare λ, prezenţa acestora în urină trebuie să ridice suspiciunea de mielom IgD.

Mielomul multiplu trebuie diferenţiat de gamopatia monoclonală benignă. Aceasta din urmă se caracterizează prin prezenţa unei Ig monoclonale sub 2g/dl, cu celelalte clase de Ig uşor scăzute; la punctatul medular, plasmocitele reprezintă mai puţin de 7% din totalul celulelor nucleate; lipseşte proteina Bence Jones şi nu apar modificări osoase. Unii din pacienţi evoluează totuşi spre mielomul multiplu (10—20% din cazuri), pe cînd alte cazuri evoluează în continuare ca o afecţiune benignă (83).

II.2.12.3.2. *MACROGLOBULINEMIA WALDENSTRÖM*

Macroglobulinemia este o boală care apare mai frecvent la bărbaţi şi diferă de mielomul multiplu prin celulele care proliferează şi care sînt asemănătoare atît cu limfocitele cît şi cu plasmocitele (celule limfocitoid-plasmocitare). Celulele amintite produc cantităţi mari de IgM. Această boală include un spectru larg de forme clinice, variind de la forme lent progresive, analoage gamopatiei monoclonale benigne, la forme maligne asemănătoare limfosarcoamelor sau leucemiei limfocitare cronice. În general, primele acuze sînt reprezentate de anemie şi, uneori, disconfort abdominal determinat de hepatosplenomegalie. La acestea se asociază limfadenopatia periferică. Cu progresiunea bolii apar semne şi simptome caracteristice unei leucemii limfocitare cronice sau unui limfosarcom. O serie de semne şi simptome sînt determinate de IgM monoclonală, moleculă mare şi asimetrică, ducînd la o hipervîscozitate a serului. Hipervîscozitatea determină tulburări vizuale şi la nivelul sistemului nervos central, putînd conduce la instalarea comei paraproteinemice. Diagnosticul trebuie suspectat atunci cînd, la examenul fundului de ochi, apar vase mult dilatate, hemoragii, exudate asociate cu prezenţa de hematii în fişicuri şi cu o hipervîscozitate a serului mai mare de 4 ori decît cea a serului normal (8). Tratamentul sindromului de hipervîscozitate se face prin plasmafereza şi iniţierea tratamentului chimioterapic. Electroforeza serului are aspect monoclonal, determinarea cantitativă a imunoglobulinelor arată IgM mult crescută, cu aspect imunoelectroforetic caracteristic.

II.2.12.3.3. *BOLILE LANŢURILOR GRELE*

Sînt boli rare, caracterizate printr-o producţie excesivă de fragmente ale lanţurilor grele, în special din fragmentul Fc. Fiecare din tipurile de boală a lanţurilor grele descrise (γ, α, μ, δ) are manifestări clinice diferite şi necesită studii imunoelectroforetice şi alte determinări speciale pentru diagnostic. Caracteristică este însă o accentuată scădere a rezistenţei la infecţii.

Boala lanțurilor grele γ a fost prima dată descrisă de Franklin și colaboratori în 1964. Apare mai ales la vîrstnici și se manifestă prin fatigabilitate, infecții recurente, limfadenopatie și splenomegalie. Tabloul clinic se aseamănă cu cel al unui limfom difuz. Este prezent și un edem al palatului moale și al luetei, deoarece nodulii limfatici Waldeyer sînt frecvent măriți în volum (semn aproape patognomonic). Sînt de asemenea prezente anemia, trombocitopenia iar în măduva hematoformatoare și nodulii limfatici sînt prezente plasmocite proliferate sau limfocite asemănătoare plasmocitelor. Boala este rapid progresivă ducînd la moarte, în cîteva luni pînă la un an. Uneori se înregistrează remisii de durată mai lungă în urma tratamentului chimioterapic. Diagnosticul trebuie suspectat pornind de la criterii clinice și confirmat prin demonstrarea Ig monoclonale atît în ser cît și în urină. Proteina monoclonală are mobilitate electroforetică identică în ser și urină și reacționează cu antiser anti-IgG (lanț γ), reprezentînd fragmentul Fc al moleculei lanțului greu (GM: 60.000 D). Nu sînt prezente lanțurile ușoare, un element important de diagnostic fiind prezența unei paraproteine în urină care nu reacționează cu antiserurile antilanț ușor k și λ (83).

Boala lanțurilor grele α este cea mai frecventă dintre bolile lanțurilor grele, bolnavii prezentînd un infiltrat plasmocitar la nivelul mucoasei intestinului subțire. Acest infiltrat duce la apariția unei malabsorbții severe, cu diaree cronică, dureri abdominale, grețuri, scădere în greutate. Cel mai frecvent sînt afectați adulții tineri din regiunea mediteranã. Diagnosticul depinde de analiza corectă a serului sau urinii, în special prin metode imunochimice, aspectul electroforetic al serului fiind în general puțin modificat. Prin imunoelectroforeză se evidențiază în ser și urină o paraproteină care este aproape întotdeauna de clasă IgA1 și nu reacționează cu antiserurile față de lanțuri ușoare; lanțurile grele ale IgA1 se evidențiază și în secreții.

Boala lanțurilor grele μ a fost descrisă doar la cîțiva pacienți, majoritatea lor avînd leucemie limfocitară cronică asociată unui component monoclonal în cantitate redusă, greu detectabil la electroforeza serului. O particularitate este reprezentată de apariția în punctatul medular de plasmocite vacuolate, care constituie 5—10% din celulele nucleate, element diagnostic pentru boala lanțurilor μ. Analiza imunoelectroforetică a serului indică prezența unei paraproteine cu migrare α_1 care reacționează cu antiserul anti-lanț greu μ, și uneori prezența de lanțuri ușoare cu mobilitate electroforetică diferită. Această migrare diferită a lanțului greu μ față de lanțul ușor este importantă pentru diagnosticul bolii. Uneori, pentru a diagnostica afecțiunile este necesară purificarea paraproteinei și analiza ei imunochimică.

Tratamentul mielomului multiplu și a celorlalte afecțiuni de tip gamopatie monoclonală se face prin administrarea de Melphalan 0,1—1 mg/kg corp/zi, timp de 7 zile, asociat cu prednison 60 mg/zi, cura fiind repetată din șase în șase săptămîni. Tratamentul trebuie să cuprindă minimum trei cure înainte de a fi întrerupt, altfel boala progresează în pofida unei terapii adecvate. Alte protocoale terapeutice aplicate, mai ales cînd apare rezistență la acest tip de cură, constau în combinații de chimioterapie, ca de exemplu Vincristina, Carmustina, Ciclofosfamida, Melphalan.

II.2.12.3.4. *AMILOIDOZA*

De la descoperirea ei de către Virchow în 1854, amiloidoza a fost considerată ca reprezentînd un grup de boli caracterizate prin depunerea în țesuturi a unui infiltrat proteic omogen cu proprietăți tinctoriale caracteristice. Cu excepția formelor localizate, amiloidoza este o boală progresivă care duce la moarte prin distrugerea organelor afectate. Rezistența amiloidului la fagocitoză și proteoliză împiedică îndepărtarea lui din depozite și duce la progresiunea manifestărilor clinice, chiar și atunci cînd boala de bază este controlată. Amiloidoza primară se caracterizează prin prezența unor depozite de amiloid fibrilare, formate din fragmente aminoterminale ale lanțurilor ușoare ale imunoglobulinelor. Aceste lanțuri ușoare denumite lanțuri ușoare ale amiloidului au greutate moleculară între 500 și 25.000. Analiza secvenței de aminoacizi arată că astfel de lanțuri ușoare conțin reziduuri identice cu regiunile variabile ale lanțului ușor al Ig și, uneori, conțin un întreg lanț ușor de Ig identic cu cel din ser. Mai mult chiar, antiserurile față de subunitățile de amiloid reacționează încrucișat (cross-reaction) cu lanțurile ușoara lambda și kapa. Din motivele amintite, sînt puține dubii că aceste proteine asemănătoare imunoglobulinelor sau precursorilor acestor proteine ar fi sintetizate de plasmocite.

Frecvența lanțurilor de amiloid asemănătoare lanțurilor λ este mult mai mare decît a celor k ce constituie lanțul ușor predominant al Ig și proteinelor mielomatoase. În acest tip de amiloidoză, apar depozite de amiloid la nivelul limbii (macroglosie), inimii, mușchilor, pielii, ligamentelor și tractului gastrointestinal. Depozitele de la nivelul vaselor și al nervilor periferici duc la hipotensiune posturală. Multe din cazurile de amiloidoză primară dacă sînt urmărite timp îndelungat și cu atenție, dezvoltă Ig monoclonale în ser și urină, plasmocitoză în punctatul medular cu apariția de gamopatii monoclonale și se asociază cu depuneri de amiloid care sînt formate tot din proteine asemănătoare lanțurilor ușoare ale Ig. Cu toate aceste acumulări de noi cunoștințe, etiologia și patogeneza amiloidozei rămîn necunoscute, unul din elementele patogenetice importante fiind reprezentat de tulburări ale mecanismelor imunoreglatoare.

II.2.12.3.5. *CONSIDERAȚII ETIOPATOGENETICE PRIVIND GAMOPATIILE MONOCLONALE*

Bolile proliferative ale plasmocitelor și limfocitelor oferă un prilej deosebit de favorabil de a face corelații între proliferarea unui anumit tip de celule, produsul lor de secreție și manifestările clinice. Pe de altă parte, persistă încă multe incertitudini cu privire la mecanismele care duc la declanșarea unor proliferări necontrolate ale anumitor clone din aceste tipuri de celule. Apare însă logică ipoteza după care o afecțiune solicitînd sistemul celulelor Ig-formatoare ar putea să preceadă cu mulți ani declanșarea proliferării neoplazice (58), iar apariția paraproteinemiei ar coincide de regulă cu transformarea malignă. De fapt, autorii finlandezi (89) au descris 5 cazuri de poliartrită cronică evolutivă la care, după mai mulți ani de evoluție, s-a dezvoltat un plasmocitom.

Stabilirea unor corelații de cauzalitate între o infecție cronică, de exemplu, tuberculoza, și dezvoltarea unei gamopatii monoclonale trebuie făcută însă cu multă rezervă deoarece per-

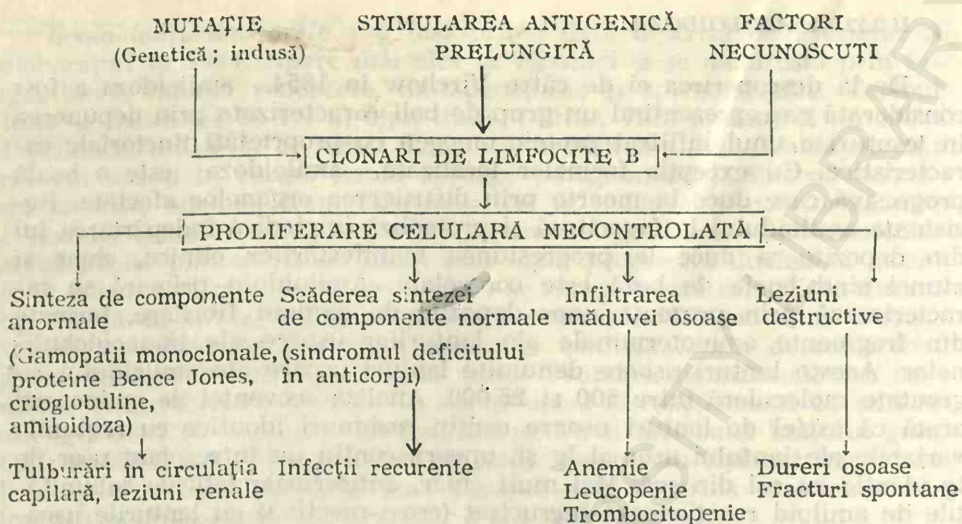


Fig. 2.19. Reprezentarea schematică a mecanismelor patogenetice din gamopatiile monoclonale

turbarea sistemului Ig-formator creează predispoziţie la infecţii, iar, în astfel de cazuri, procesul infecţios este mai degrabă consecinţa şi nu cauza paraproteinemiei. În figura 2.19 este prezentată o schemă a mecanismelor care ar putea fi implicate în patogeneza hiperimunoglobulinemiilor monoclonale.

II.2.12.4. HIPERIMUNOGLOBULINELE POLICLONALE

Creşteri ale Ig pot fi produse şi prin proliferarea mai multor clone de plasmocite asociate cu creşteri ale uneia sau mai multor clase de Ig. Determinarea cantitativă a Ig precizează care din clasele de Ig cresc. Aspectul imunoelectroforetic în aceste cazuri se aseamănă cu cel al Ig normale, arcul corespunzător Ig proliferate fiind mai îngroşat. La electroforeza serului se constată o creştere a fracţiunii γ. Creşteri ale Ig se întîlnesc în afecţiuni cu patogeneză imună, cum ar fi colagenozele, unele afecţiuni inflamatorii hepatice şi renale şi unele boli infecţioase. Aceste creşteri se realizează prin mecanisme diferite implicînd tulburări ale cooperării dintre limfocitele T şi B. Se incriminează fie o hiperreactivitate a limfocitelor B, fie persistenţa unor factori care stimulează funcţiile limfocitului B. În tabelul 2.13 sînt redate modificările Ig individuale în unele boli evoluînd cu hipergamaglobulinemie.

Determinarea strictă numai a nivelului seric al Ig nu reflectă întotdeauna fidel implicarea lor într-un proces patogenetic. Nivelul lor seric trebuie corelat cu cel al complexelor imune circulante (acestea fiind complexe antigen-anticorp, CIC) şi depozitele tisulare de Ig. Astfel în majoritatea bolilor renale, concentraţiile serice ale Ig sînt normale sau puţin modificate, în schimb ele sînt depozitate la nivelul rinichiului împreună cu proteinele sistemului complement. Orice răspuns imun umoral la un antigen străin sau propriu poate duce la formarea de complexe imune. Utilizîndu-se diferite modele experimentale s-a putut stabili modalitatea prin care CIC devin patogene (91). După pătrunderea unui antigen în circulaţie se formează CIC în care antigenul este în exces (nu

Tabelul 2.13

Nivelul imunoglobulinelor serice în diferite boli

Boala	IgG	IgA	IgM
Colagenoze			
Lupus eritematos sistemic	↑↑	N↑	↑↑
Poliartrita reumatoidă	N↑↑↑	↑↑↑	↑↑
Sclerodermie	N↑	N	N↑
Sindrom Sjögren	N↑	N↑	N↑↑
Boli hepatice			
Hepatita virală acută	N↑	N↑	N↑↑
Hepatita cronică activă	↑↑	↑	N↑↑
Ciroza hepatică	↑↑↑	↑↑	N↑↑
Ciroza biliară primitivă	N	N	↑↑↑
Boli infecțioase			
Mononucleoza infecțioasă	↑↑	N↑	↑↑
Tuberculoza	↑↑	N↑	N↑
Endocardita bacteriană	↑↑	N↑	↑↑↑
Actinomicoza	↑↑↑	↑↑	↑↑↑

s-au produs încă suficiente Ig specifice) și care sînt solubile și nepatogene. O dată cu proliferarea clonală, se accentuează producția de anticorpi și se formează CIC la echivalență, realizînd agregate solubile de mărime și complexitate crescute. O parte dintre acestea se depozitează în diferite organe și pot declanșa un răspuns inflamator local. În cazul epuizării antigenului, se formează CIC în exces de anticorp, care cu antigenele monovalente formează CIC polimerizate cu greutate moleculară mare; acestea sînt îndepărtate din circulație prin captare în macrofage. După îndepărtarea antigenelor rămîn numai anticorpi liberi în circulație. Recent se acordă o importanță crescîndă rolului complexelor imune formate *in situ*, imunoglobulinele fiind direcționate împotriva unor antigene tisulare care sînt captate sau plantate în structurile tisulare (16). Atît CIC cît și complexele imune localizate în țesuturi mediază leziunea tisulară prin intermediul activării complementului, a neutrofilelor și plăcuțelor cu eliberare de mediatori de tipul aminelor vasoactive.

Determinarea CIC poate oferi informații directe asupra implicării acestora la producerea leziunilor patologice din diferite boli. Caracterizarea CIC din punctul de vedere al compoziției antigenice, al claselor de imunoglobuline sau al componentelor de complement legate în complex aduce informații în plus despre rolul lor patogenetic (18).

II.2.12.5. CRIOGLOBULINELE

Crioglobulinele sînt Ig care au proprietatea de a forma un precipitat sau gel la rece. Fenomenul este reversibil, în general, la creșterea temperaturii. Pentru determinarea lor corectă, serul bolnavului trebuie separat la 37°C și urmărit timp de 7 zile la 4°C în special în cazul crioglobulinemiilor mixte. Citirea rezultatelor la 24—28 h poate duce la rezultate fals negative. Crioglobulinele se clasifică în crioglobuline monoclonale, formate din IgG sau IgA sau IgM, și se întîlnesc în mielomul multiplu sau macroglobulinemie. Al doilea tip de crioglobuline sînt cele mixte care pot fi IgG—IgM și IgG—IgM—IgA. Apar în majo-

ritatea colagenozelor, în mononucleoza infecţioasă, endocardita bacteriană, hepatite virale acute şi cronice, ciroze, glomerulonefrite şi limfoame. În cazul crioglobulinemiilor monoclonale, simptomele survin rar, fiind reprezentate în special de fenomenul Raynaud, ulcere cutanate, gangrenă. Într-un caz de mielon IgA şi tulburări ale circulaţiei periferice, urmărit în serviciul nostru, prezentînd o hiperproteinemie de 14,5 g/dl şi crioglobulinemie, gelificarea spontană a plasmei la 25°C făcea imposibilă obţinerea serului. Analizele au putut fi efectuate doar atunci cînd serul prelucrat din sîngele care a fost coagulat la 37°C era diluat cu ser fiziologic încălzit.

Crioglobulinemiile mixte au semnificaţie de CIC, iar consecinţele lor pot fi cel mai clasic demonstrate la pacienţii cu crioglobulinemie mixtă esenţială. Boala a fost descrisă pentru prima dată în 1965 de către Loghem şi colaboratori constînd în purpură, artralgii, astenie, deseori complicate cu fenomene Raynaud, tiroidite şi serozite. O parte din bolnavi dezvoltă în evoluţie glomerulorefrită care progresează spre insuficienţă renală şi moarte cu angeită necrotizantă a arterelor renale medii şi mici. La nivelul rinichiului pot fi evidenţiate depozite granulare de IgG, IgM şi fracţiuni de complement, localizate de-a lungul anselor glomerulare. În unele cazuri, leziunile renale au o evoluţie favorabilă, spre remisie. În 90% din cazuri se evidenţiază, de asemenea, şi semnele unei afectări hepatice. Două treimi din pacienţi au avut în antecedente hepatită virală acută de tip B iar la unii din aceştia AgHBs este regăsit în crioglobuline sau ser. Tratamentul include administrarea de prednison, plasmafereza şi citostatice aplicîndu-se doar atunci cînd pacienţii devin simptomatici.

II.2.13. ALTE PROTEINE PLASMATICE

Plasma mai conţine şi alte proteine dintre care unele intervin în procesele de coagulare şi fibrinoliză, fiind de domeniul biochimiei hemostazei, iar altele au rol în transportul specific al unor substanţe micromoleculare.

Între proteinele de transport specific se disting acelea cu rol în fixare, transport şi cedare la organele ţintă a diverşilor hormoni. Aşa sînt prealbumina, α1-globulina fixatoare a tiroxinei, cu rol în transportul hormonilor tiroidieni, β-globulina fixatoare a steroizilor, cu rol în transportul estradiolului şi al testosteronului precum şi transcortina (migrare inter-α), cu rol în transportul cortisolului. Fiziopatologia şi semnificaţia diagnostică a modificărilor suferite de aceste proteine plasmatice avînd concentraţie între 0,4 mg/dl, în cazul β-globulinei fixatoare a steroizilor, şi 25 mg/dl în cazul proteinei cu migrare înaintea albuminei (prealbumina) interesează mai ales endocrinologia.

Transportul unor vitamine este, de asemenea, asigurat de anumite proteine plasmatice. Aşa de exemplu, vitamina A (retinol) este transportată de prealbumină şi de o α 2-globulină (retinol binding protein) iar vitamina B 12 este fixată şi transportată de două aşa-numite „transcobalamine", transcobalamina I, cu migrare α1, şi transcobalamina II cu migrare β.

Mai amintim de prezenţa în plasmă a unor glicoproteine cu rol de fixare a hemoglobinei rezultate în procesul de hemoliză. Astfel de haptoglobine, prezentînd un polimorfism genetic (tip 1—1, 2—1, 2—2), cresc în procesele inflamatorii acute şi scad în insuficienţa hepatică (deficit de sinteză) şi în procesele de deglobulinizare din anemiile hemolitice (consum excesiv de haptoglobină). Intervenţia hemopexinei în procesul de captare a hemului oxidat (methem) va fi prezentată în capitolul V (vezi pag. 263).

II.3. PROTEINELE PLASMATICE ÎN DIAGNOSTICUL DE LABORATOR

(Tipuri de disproteinemie)

Conform celor relatate, concentrațiile diverselor proteine plasmatice se modifică în extrem de numeroase stări patologice. Interpretarea datelor de laborator privind comportarea proteinelor plasmatice este însă mult ușurată atunci cînd se ține seama că modificările suferite de aceste proteine pot fi încadrate în cîteva tipuri de disproteinemie relativ ușor de recunoscut prin simpla examinare a aspectului realizat prin separarea electroforetică a proteinelor plasmatice în cinci fracțiuni. Principalele aspecte realizate de proteinogramă în patologia clinică sînt redate sintetic în figura 2.20.

a. *Disproteinemia reactivă din inflamația acută* se caracterizează prin creșterea α_2 și mai rar a α_1 globulinelor. Analiza diferențiată prin metode imunologice relevă în această reacție de fază acută o creș-

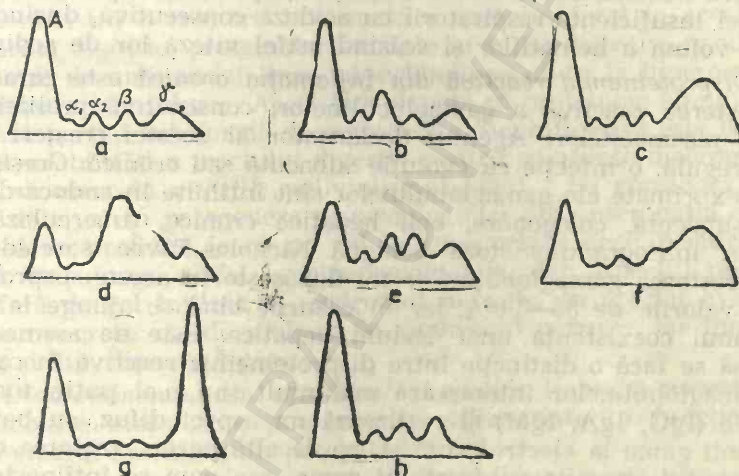


Fig. 2.20. Tipuri de disproteinemie (exemple ilustrative grafice și numerice). a) Normal (vezi tabelul 1). b) *Inflamație acută*: proteine totale = = 7,5 g/dl, din care A = 49% (3,67 g/dl; α1 = 6% (0,45 g/dl); α2 = = 17% (1,28 g/dl); β = 10% (0,75 g/dl) γ = 19% (1,42 g/dl). c) *Inflamație cronică*: proteine totale = 8,2 g/dl din care A = 45% (3,69 g/dl); α1 = 4% (0,36 g/dl); α2 = 9% (0,74 g/dl); β = 11% (0,9 g/dl); γ = 31% (2,54 g/dl). d). *Sindrom nefrotic*: proteine totale = 4,3 g/dl din care A = 20% (0,86 g/dl); α1 = 3% (0,13 g/dl); α2 = 40% (1,72 g/dl); β = = 19% (0,82 g/dl); γ = 18% (0,77 g/dl). e) *Enteropatia exudativă*: proteine totale = 4,6 g/dl din care A = 35% (1,61 g/dl); α1 = 10% (0,46 g/dl); α2 = 14% (0,64 g/dl); β = 16% (0,74 g/ /dl); γ = 25% (1,15 g/dl). f) *Ciroză hepatică*: proteine totale = 5,2 g/dl din care A = 33% (1,71 g/dl); α1 =4 (0,21 g/dl); α2 = 6% (0,31 g/dl); β = 15% (0,78 g/dl) γ = 42% (2,68g/dl) g) *Mielom multiplu*: proteine totale = 10,3 g/dl din care A = 27% (2,78 g/dl) α1 = 4% (0,41 g/dl); α2 = 8% (0,82 g/dl); β = 94% (0,93 g/dl); γ = 52% (5,35 g/dl). h) *Hipogamaglobulinemia*: proteine totale = 7,1 g/dl din care A = 59% (4,19 g/dl); α1 = 6% (0,43 g/dl); α2 = 12% (0,85 g/dl); β = 18% (1,22 g/dl); γ = 4% (0,28 g/dl).

tere a α_1 antitripsinei, α_1 glicoproteinei acide, haptoglobinei, ceruloplasminei și proteinei C-reactive, în timp ce albumina, transferina, pseudocolinesteraza, precum și α_1 și β lipoproteinele scad. Se constată totodată o creștere a fibrinogenului și o accelerare corespunzătoare a VSH-ului, care este, în mare măsură, dependent de nivelul fibrinogenemiei. Inhibitorii activării plasminogenului cresc semnificativ, iar factorul stabilizator al fibrinei (factorul XIII) este ușor diminuat. Modificări similare se întîlnesc nu numai în infecții acute, dar și postoperator, în procese tumorale sau după infarctul miocardic acut și denotă reacția organismului la distrucțiile tisulare. Nu s-a putut preciza încă pe deplin mecanismul prin care produșii de degradare tisulară declanșează reacția de fază acută (vezi și pag. 154). În orice caz, detectarea acestor modificări umorale contribuie la diagnosticul diferențial al unor afecțiuni. Astfel, în meningitele purulente, globulinele α_1 și α_2 cresc foarte mult, în timp ce în meningitele virotice, aceste modificări sînt abia schițate. Globulinele α cresc de asemenea în pneumopatiile de origine bacteriană, fiind nemodificate în pneumopatiile virotice. Este de notat faptul că în bronhopneumopatii grave, globulinele α_2 și fibrinogenul cresc, dar VSH-ul este adesea nemodificat. Această discrepanță poate fi explicată prin existența unei insuficiențe respiratorii cu acidoză consecutivă, ducînd la mărirea de volum a hematiilor și scăzînd astfel viteza lor de sedimentare

b. *Disproteinemia reactivă din inflamația cronică* este caracterizată prin creșterea reactivă a gamaglobulinelor, consecutivă proliferării reactive a plasmocitelor. Agentul declanșator al acestei creșteri reactive este, de regulă, o infecție cu evoluție subacută sau cronică. Creșteri deosebit de exprimate ale gamaglobulinelor sînt întîlnite în endocardita bacteriană subacută, colagenoze, boli hepatice cronice, tuberculoză, boala Kala-azar, limfogranulomatoza benignă Nicholas-Favre, sarcoidoza. De regulă, creșterea gamaglobulinelor nu depășește în aceste disproteinemii reactive valorile de 35—38%, iar în cazurile cînd se ajunge la 40% se poate bănui coexistența unor leziuni hepatice. Este de asemenea important să se facă o distincție între disproteinemia reactivă în care creșterea gamaglobulinelor interesează mai mult sau mai puțin toate subfracțiunile (IgG, IgA, IgM) și realizează un aspect difuz, cu baza largă a fracțiunii gama la electroforeză și, pe de altă parte, creșterea omogenă în pisc a unei anumite subfracțiuni gama, așa cum se întîlnește în gamopatiile monoclonale. Creșterea gamaglobulinelor se însoțește de o pozitivare a testelor de labilitate coloidală a serului iar VSH-ul este accelerat în măsura în care coexistă o creștere a fibrinogenemiei. De notat că fibrinogenul și alfa-2 globulinele cresc mai ales în cursul puseelor evolutive ale procesului cronic. Merită subliniată observația că în endocardita bacteriană subacută se constată o creștere a gamaglobulinelor, pe cînd în endocardita reumatică recidivantă predomină creșterea α_2 globulinelor.

c. *Disproteinemia din pierderile de proteine pe cale renală,* întîlnită în sindromul nefrotic, se caracterizează prin scăderea proteinelor totale, scăderea extrem de accentuată a albuminei și creșterea globulinelor α_2 și β. În formele severe, scade și concentrația gamaglobulinelor. Fibrinogenul plasmatic este, de regulă, crescut, constatîndu-se totodată o creștere marcată a colesterolului și lipidelor serice. Toate aceste mo-

dificări pot fi în mare măsură explicate prin creșterea permeabilității filtrului glomerular față de proteine. De fapt, scăderea interesează în primul rînd proteinele cu greutate moleculară mică, cum ar fi albumina, α_1AT și transferina în timp ce proteinele cu greutate moleculară mare (α2 macroglobulina, fibrinogenul, lipoproteinele, IgM) cresc. Lipsa de eliminare urinară nu poate explica însă creșterea în valori absolute a concentrației unora din aceste proteine cu greutate moleculară mare. Există dovezi că în sindromul nefrotic, sinteza unor proteine este mult accelerată. Pseudocolinesteraza serică crește, ea fiind o enzimă cu greutate moleculară mare, a cărei sinteză decurge paralel cu sinteza de albumină. Sinteza de gamaglobuline pare a fi diminuată în sindromul nefrotic. Nu trebuie uitat că în producerea disproteinemiei din sindromul nefrotic contribuie și o oarecare creștere a permeabilității endoteliilor capilare, care suferă din cauza hipoproteinemiei, ducînd la o reducere a volumului plasmatic (vezi și pag. 155).

d. *Disproteinemia din pierderea enterală de proteine* survine în enteropatia exudativă și reprezintă o exagerare patologică a procesului fiziologic de eliminare, în tractul digestiv, a proteinelor plasmatice. S-a putut demonstra o creștere însemnată a azotului fecal la acești bolnavi iar în urma digestiei proteinelor exudate în tubul digestiv, rezultă o cantitate mare de aminoacizi, care, absorbindu-se, duce la hiperaminoacidemie și hiperaminocidurie. Acest fapt denotă că proteinele eliminate se recuperează parțial sub formă de aminoacizi. Semnificativă este constatarea unei permeabilități a tractului digestiv pentru substanțe macromoleculare (albumină marcată cu ^{131}I, polivinilpirolidonă). Se consideră, pe baza acestor date, că în patogeneza disproteinemiei din enteropatia exudativă, pierderea de proteine joacă un rol mai important decît perturbarea absorbției. Se ajunge astfel la hipoproteinemie, dar aspectul proteinogramei diferă de cel întîlnit în sindromul nefrotic. În special α_2 și β globulinele nu cresc așa de mult ca în sindromul nefrotic, iar hipercolesterolemia și hiperlipemia lipsesc.

e. *Disproteinemia din afecțiunile hepatice* îmbracă aspecte diferite și recunoaște mecanisme patogenetice diferențiate în funcție de etiologia și stadiul evolutiv al hepatopatiei.

Modificările proteinogramei în hepatita acută sînt puțin exprimate și necaracteristice și, în consecință, au o valoare diagnostică mai redusă în comparație cu creșterea impresionantă a transaminazelor. Se notează o scădere a albuminelor și o creștere moderată a gamaglobulinelor. Deși este vorba de un proces acut, α_2 globulinele nu cresc în hepatita virală acută. Aceasta se explică atît prin etiologia virală, cît și prin faptul că α_2 globulinele sînt produse chiar de ficat. Dintre testele de labilitate coloidală a serului notăm pozitivitatea bruscă a timolului în hepatita virală acută. În sindromul posthepatitic, nivelul crescut al gamaglobulinelor persistă și se poate uneori accentua atrăgînd în acest fel atenția asupra evoluției spre cronicizare. În hepatita cronică, aspectul disproteinemiei este acela de inflamație cronică, fiind caracterizat prin creșterea gamaglobulinelor. Ca și în alte inflamații cronice, creșterea gamaglobulinelor este difuză și se însoțește de o pozitivare a testelor de labilitate coloidală a serului. Disproteinemia este mult mai severă în cirozele hepatice, întrucît, în astfel de cazuri, la inflamația cronică evolutivă se adaugă și alte

mecanisme, cum ar fi pierderea de proteine în lichidul de ascită și insuficiența funcțională a ficatului. Din acest motiv se produce o scădere marcată a albuminelor care, de regulă, este asociată cu o scădere a sintezei de pseudocolinesterază. Procesul de degradare a gamaglobulinelor la nivelul ficatului este perturbat. Așa se explică creșterea gamaglobulinelor la valori procentuale de peste 40% (2—2,5 g/dl). Evacuările frecvente ale lichidului de ascită pot întreține și agrava disproteinemia. De notat că, spre deosebire de hepatite cronice și ciroze, în angiocolite și în cirozele biliare, nivelul α_2 globulinelor este crescut. În stadiile de debut ale neoplaziilor hepatice, electroforeza proteinelor serice are o valoare diagnostică redusă, dar în adenocarcinomul hepatic cu ciroză la scăderea albuminelor și creșterea gamaglobulinelor se asociază adeseori o creștere a fracțiunii α_1. Metode imunologice permit evidențierea unei α_1 globuline fetale, alfafetoproteina, la bolnavii cu hepatom (vezi pag. 105).

f. *Disproteinemia din gamopatiile monoclonale* realizează un aspect caracteristic cu o bandă îngustă intens colorată în domeniul gama și care, la fotometrare, dă aspect de pisc (vezi capitolul respectiv).

g. *Disproteinemia din hipogamaglobulinemii* este ușor de recunoscut constînd în scăderea accentuată a gamaglobulinelor în proteinogramă (vezi capitolul de imunodeficite primare).

Date din literatură se referă la așa-numitele *disproteinemii prin defect*, cauzate de un deficit al aparatului genetic responsabil de sinteza unei anumite proteine plasmatice. În principiu, fiecare din numeroasele proteine plasmatice poate fi afectată de un defect genetic. În prezentul capitol, astfel de defecte cum sînt *analbuminemia*, deficitul de *1 antitripsină*, deficitul de *transferină* precum și deficitul de *imunoglobuline* au fost tratate în legătură cu date privind structura și funcția acestor proteine plasmatice.

II.4. ASPECTE ALE REGLĂRII SINTEZEI HEPATICE DE PROTEINE PLASMATICE

Așa cum s-a mai arătat, insuficiența hepatică se asociază cu scăderea nivelului multor proteine plasmatice, iar observații experimentale, efectuate prin perfuzia ficatului izolat sau pe culturi de hepatocite, demonstrează că aceste celule constituie cel mai important loc de sinteză al majorității proteinelor din plasmă. Pe de altă parte, în timp ce stimulii și mecanismele care reglează sinteza de imunoglobuline în limfocitele B și în plasmocite sînt destul de temeinic studiate (vezi pag. 132), se cunosc încă prea puține detalii cu privire la reglarea sintezei de proteine în hepatocite. Observațiile clinice au sugerat însă de multă vreme că scăderea nivelului plasmatic al unor proteine (de exemplu al albuminei) se poate datora nu numai unei reduceri a *capacității de sinteză* dar și unor *variații în procesul de reglare a sintezei* proteinelor. Un exemplu tipic în acest sens îl constituie reacția de fază acută din cursul proceselor inflamatorii sau postoperator, cînd creșterea fibrinogenului, α_1 antitripsinei, inhibitorilor fibrinolizei, α glicoproteinei acide, haptoglobinei, ceruloplasminei și proteinei C reactive se însoțește de scăderea concomitentă a albuminei serice, colinesterazei, transferinei, factorului XIII, stabilizator al fibrinei, și a lipoproteinelor.

Studii recente, efectuate prin condiționarea mediului de cultură a hepatocitelor, respectiv prin adaosul unor agenți stimulanți la mediu, au adus precizări extrem de interesante.

S-a demonstrat astfel că sinteza hepatică de protrombină este stimulată printr-un mecanism de feed-back pozitiv în care produșii de degradare ai acestui factor al coagulării acțio-

nează direct asupra hepatocitelor. În opoziție cu mecanismul direct arătat mai sus, sinteza hepatică de fibrinogen este reglată în mod indirect prin intermediul unei căi mediate de macrofage. De fapt stimularea macrofagelor și respectiv a monocitelor cu produși de degradare ai fibrinogenului, precum și cu endotoxine sau diverse lipopolizaharide duce la eliberarea, in mediul de cultură, a unor factori care, acționînd apoi asupra hepatocitelor, determină o accelerare pronunțată a sintezei de fibrinogen și α1 antitripsină, iar, într-o măsură mai redusă, stimulează și sinteza de antitrombină III (39). S-au putut astfel identifica diverse monokine (citokine) eliberate din monocitele stimulate și există dovezi după care fiecare din ele exercită efecte bine definite și diferențiate asupra hepatocitelor. Așa de exemplu, interleukina-1 (IL-1) și factorul de necroză tumorală (TNF), considerat de unii autori ca fiind identic cu așa-zisa cașectină (96), determină accelerarea sintezei hepatice de α1-glicoproteină acidă, de haptoglobină și de proteina C_3 a complementului, în timp ce o a treia monokină, denumită factor de stimulare a hepatocitelor (HSF), determină creșterea sintezei hepatice a fibrinogenului, a α_1 chimotripsinei și a α_2 macroglobulinei.

Alte monokine, ca de exemplu interleukina-6 (IL-6), încă insuficient caracterizate biochimic, stimulează sinteza hepatică a α1 antitripsinei, ceruloplasminei, proteinei C reactive și amiloidului seric A. Nu există încă informații suficiente cu privire la agenții care determină accelerarea sintezei de inhibitori ai fibrinolizei, așa cum sînt inhibitorul activatorului plasminogenului (PAI) și α2 inhibitorul plasminei (α2PI). Se știe însă că toate monokinele amintite determină concomitent cu accelerarea sintezei proteinelor de fază acută, și o reducere marcată a sintezei hepatice de albumină (97).

De notat că hormonii glicocorticoizi reduc producția de monokine exercitînd și pe această cale un efect antiinflamator.

Pe baza experiențelor, efectuate pe culturi de celule hepatice, s-ar părea că inducerea proteinelor de fază acută se realizează prin mecanisme variate și respectiv prin stimuli relativ specifici.

Pe de altă parte, există observații după care sinteza hepatică de proteine ar putea fi accelerată și prin mecanisme mai puțin specifice. Așa de exemplu, pierderea urinară de proteine și scăderea consecutivă a presiunii coloidosmotice, survenită in sindromul nefrotic, determină o stimulare cu caracter global a sintezei de proteine in ficat (98). Ca urmare, concentrația diverselor proteine din plasma bolnavilor nefrotici este o rezultantă a gradului de pierdere urinară, pe de-o parte, și a intensității accelerării compensatorii a sintezei hepatice. Astfel, nivelul plasmatic al proteinelor cu greutate moleculară relativ mică, așa cum sînt albumina, transferina, α1 antitripsina și antitrombina III scade, in timp ce concentrația celor cu greutate moleculară mare crește. Așa este cazul cu fibrinogenul, fibronectina, factorul XIII, α2 macroglobulina, colinesteraza și lipoproteinele. De notat că pierderea urinară a proteinelor plasmatice depinde nu numai de greutatea moleculară relativ mai mică dar și de sarcina lor electrică. Astfel, deși au o greutate moleculară mai joasă decit albuminele, proteazele serinice dependente de vitamina K (protrombina, factorii VII, IX, X și proteina C a coagulării), dotate cu radicali γ-carboxiglutamici și avind o puternică încărcare electronegativă, sînt respinse de capsula lui Bowman, iar pierderea lor urinară este mai puțin severă. În consecință, nivelul lor plasmatic nu scade, ci de multe ori chiar crește datorită stimulării globale a sintezei hepatice de proteine (19).

Conform celor semnalate într-un capitol precedent (vezi pag. 43) in multe cazuri de hiperlipoproteinemie tip II b și IV, caracterizate de regulă printr-o accelerare a sintezei hepatice de lipoproteine cu densitate foarte joasă (VLDL), se constată nu numai o creștere a enzimelor de secreție hepatică cu posibile implicații in metabolismul lipidic, așa cum sînt colinesteraza serică și lecitin-colesterol transferaza, dar și a altor proteine plasmatice produse de ficat, ca de exemplu, factorul XIII, fibronectina și factorii coagulării dependenți de vitamina K (20). Creșteri moderate, dar semnificative, se constată la astfel de subiecți și

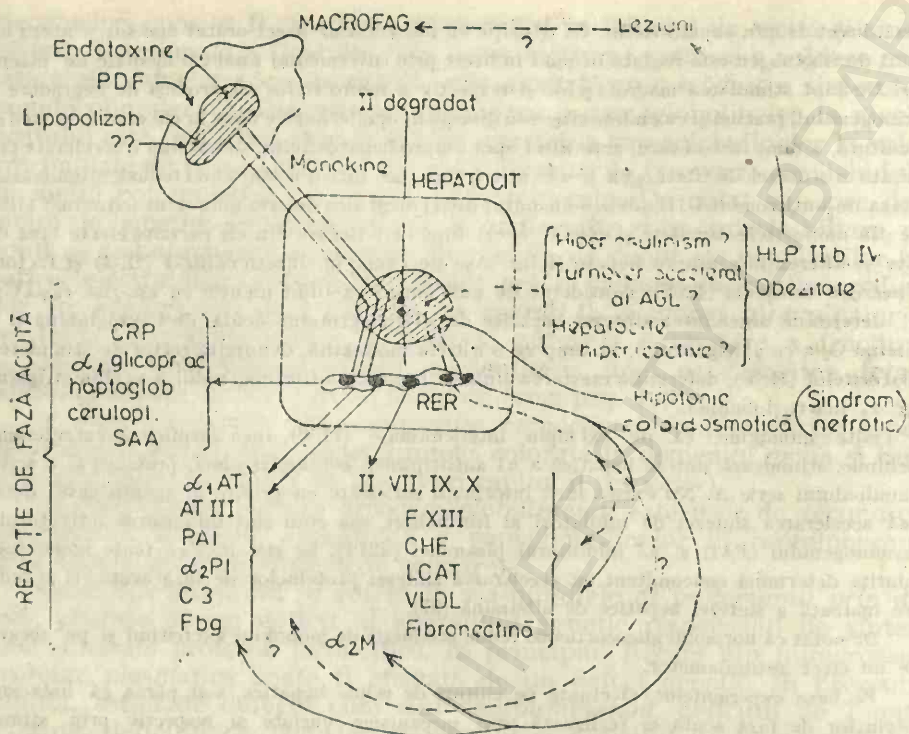


Fig. 2.21. Reprezentare schematică a unor mecanisme implicate in reglarea sintezei hepatice de proteine plasmatice. În unele situaţii, ca de exemplu în cazul protrombinei (II), sinteza proteinei este stimulată printr-un efect direct al produşilor săi de degradare asupra hepatocitelor. Alteori, ca de exemplu în cursul reacţiei inflamatorii, macrofagele stimulate eliberează diverse monokine (vezi textul) care determină accelerarea secreţiei unor proteine de fază acută asociată cu scăderea concomitentă a sintezei de lipoproteine, de albumină şi de colinesterază serică. În figură este indicată şi posibilitatea unor stimulări mai nespecifice, ca de exemplu, prin hipotonia coloidosmotică (în sindromul nefrotic) sau in legătură cu accelerarea sintezei de lipoproteine în anumite tipuri de hiperlipoproteinemii. PDF — produşi de degradare ai fibrinei; CRP-proteina C-reactivă; SAA-amiloidul seric A; α_1AT — α_1 antitripsină, AT III-antitrombina III, PAI — inhibitorul activatorului plasminogenului; α_2PI α_2 — inhibitorul plasminei; Fbg — fibrinogen; α_2M α_2 macroglobulina; CHE — colinesteraza serică, LCAT — lecitincolesterolaciltransferaza.

în ceea ce priveşte unele proteine considerate a fi „de fază acută", cum sînt fibrinogenul, componenta C_3 a complementului $\alpha_1$antitripsina, inhibitorii fibrinolizei şi antitrombina III. Mecanismele care determină aceste modificări, afectînd o serie de proteine plasmatice de secreţie hepatică la bolnavii cu hipertrigliceridemie endogenă, sînt încă neelucidate.

În principiu, s-ar putea însă incrimina o reactivitate particulară a hepatocitelor, mai susceptibile la diverşi stimuli sau agenţi inductori, cum ar putea fi hiperinsulinismul sau viteza accelerată de turn-over a acizilor graşi liberi şi a lipoproteinelor. Pe de altă parte, leziunile vasculare condiţionate de hiperlipoproteinemie ar putea duce la activarea locală a macrofagelor, iar produşii eliberaţi de aceste celule, acţionînd asupra unor hepatocite hiperreactive, ar determina şi creşterea moderată a fibrinogenemiei şi a inhibitorilor de proteaze (vezi fig. 2.21).

O situaţie particulară a sintezei hepatice de proteine se întîlneşte în cursul colestazei. La astfel de bolnavi, alături de creşterea enzimelor indicatoare ale colestazei (fosfatază alcalină, γ-glutamil-transferază, 5-nucleotidază, leucinaminopeptidază), se constată şi nivele plasmatice crescute ale fibrinogenului, inhibitorilor de proteaze şi a unor factori ai coagulării. Verigile intermediare între retenţia de acizi biliari şi modificările amintite ale proteinelor plasmatice nu sînt încă elucidate. În orice caz, stimularea sintezei de proteine nu afectează albumina şi colinesteraza, al căror nivel scade în colestaza severă.

BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

1. Aoki, N., *Natural inhibitors of fibrinolysis*, Prog. Cardiovasc. Dis., 1979, 21, 267.
2. Baciu, I., Cucuianu, M., Prundeanu, C., Bociat, T., *Hipobetaglobulinemie cu tulburarea transportului şi utilizării fierului*, Fiziologia, 1960, 6, 101.
3. Barrett, A. J., *Alpha-2-macroglobulin*, Meth. Enzymol., 1981, 80, 403.
4. Berek, J. S., Knapp, R. C., Malkasian, G. D., Laniu, P. T., Whitney, C., Niloff, Bast, R. C., *Ca125 serum levels correlated with second-look operations among ovarian cancer patients*, Obstet. Gynecol., 1986, 67, 685.
5. Bhakdi, S., Tranum-Jensen, J., *Membrane damage by complement*, Biochim. Biophys. Acta, 1983, 737, 343.
6. Borth, W., *Role of alpha-2-macroglobulin in joint inflammation; humoral and cellular aspects*, Agent Action, 1984, 15, 105.
7. Boks, A. L., Brommer, E. P., Schalm, S. W., van Vliet, H. D., *Hemostasis and fibrinolysis in severe liver failure and their relation to hemorrhage*, Hepatology, 1986, 6, 79.
8. Bradford, D. A., Dickerman, H. L., Johnson, W. E., *Alpha-fetoprotein relationship between maternal serum and amniotic fluid levels*, Amer. J. Obstet. Gynecol., 1985, 151, 1038.
9. Breit, S. M., Wakefield, D., Robinson, J. P., Luckhurst, E., Clark, P., Penny, R., *The role of alpha-1-antitrypsin deficiency in the pathogenesis of human disorders*, Clin. Immunol. Immunopathol, 1985, 35, 363.
10. Carr, W. P., *Acute phase proteins. Clinics in Rheumatic Disease*, 1983, 9, 227.
11. Carrell, R. W., *Alpha-1-antitripsina; Molecular Pathology, leukocytes and tissue damage*, J. Clin. Investt, 1986, 78, 1427.
12. Carson, S., Lavietes, B. B., Diamond, H. S., Kinney, S. G., *The immunoreactivity, ligand cell binding characteristics of rheumatoid synovial fluid fibronectin*, Arthritis Rheum., 1985, 28, 601.
13. Colman, R. W., *The role of plasma proteases in septic shock*, N. Engl. J. Med., 1989, 320, 1207.
14. Conlan, M. G., Tomasini, B. R., Schultz, R. L., Mosher, D. F., *Plasma vitronectin polymorphism in normal subject and patients with disseminated intravascular coagulation*, Blood, 1988, 72, 185.
15. Cooper, N., *Laboratory evaluation of complement activation*, in „*Immunoassays; Clinical laboratory techniques for the 1980*"(Nakamura, R. M., Dito, W. R., Tucker, E. S. Ed), Allan R. Liss Inc. New York, 1980, p. 3393.
16. Couser, W. G., *In situ formation of immune complexes and role of complement activation in glomerulonephritis*, Clinics in Immunology and Allergy, 1986, 6, 267.
17. Cox, D. W., Johnson, A. M., Fagerhol, M. K., *Report of nomenclature meeting for alpha-1-antitrypsin*, Hum. Genet., 1980, 53, 429.

18. Cristea, A., Rus, H. G., Niculescu, F., Bedeleanu, D., Vlaicu, R., *Characterization of circulating immune complexes in heart disease*, Immunol. Lett., 1986, 13, 45.
19. Cucuianu, M., Rus, H. G., Cristea, A., Niculescu, F., Bedeleanu, D., Poruţiu, D., Roman, S., *Clinical studies on plasma fibronectin and factor XIII; With special reference to hyperlipoproteinemia*, Clin. Chim. Acta, 1985, 147, 273.
20. Cucuianu, M., *Biochimia clinică a hemostazei*, Ed. Dacia, Cluj-Napoca, 1983.
21. Cucuianu, M., *Biochimie clinică*, Ed. Dacia, Cluj-Napoca, 1977.
22. Cucuianu, M., Popescu, T. A., Hărăguş, S., *Inhibition of fibrinolysis in a urokinase activated system.*, Rev. Roum. Med. Int., 1972, 9377.
23. Cucuianu, M. P., Rus, H. G., Roman, S., Mărcuşiu, C., Spinu, C., Manasia, M., Niculescu, F., *Tissue-Type plasminogen activator (t—PA) and dilute blood clot lysis time in nephrotic patients*, Thromb. Haemostas., 1989, 61, 270.
24. Delpre, G., Gilat, T., *L'alpha-fetoproteine*, Gastroenterol. Clin. Biol., 1978, 2, 87.
25. Dreskin, S. C., Goldsmith, P. K., Gallin, J. L., *Immunglobulins in hyperimmunoglobulinnemia E and recurent infection (Job's) syndrome*, J. Clin. Invest., 1985, 75, 26.
26. Engström, W., Hyldahl, L., Walergren, P., *Urinary excretion of beta-2-microglobulin in myeloma patients*, Clin, Chim. Acta, 1980, 108, 369.
27. Eriksson, S., Carlson, J., Welez, R., *Risk of cirrhosis and primary liver cancer in alpha-1-antitrypsina deficiency*, N. Engl. J. Med., 1986, 314.
28. Eriksson, L. A., Schleef, R. R., Ny. T., Loskutoff, D. J., *The fibrinolytic system of the vascular Wall*, Clinics in Haematology, 1985, 14, 513.
29. Falk, R. J., Dalmasso, A. P., Kim, Y., Lam, S., Michael, A. F., *Radioimmunoassay of the attack complex of complement in serum from patients with systemic lupus erythematosus*, N. Engl. J. Med., 1985, 312, 1594.
30. Foon, K. A., Todd, R. F., *Immunologyc deposition of leukemia and lymphoma. Blood*, 1986, 68, 1.
31. Garvier, R. I., Mornex, J. F., Nukiwa, T., Brantley, M., Courtney, M., Lecocq, J. P., Crystal, R. G., *Alpha-1-antitrypsin deficiency and emphysema caused by homozygous inheritance of non-expressing alpha-1-antitrypsin genes*, N. Engl. J. Med., 1986, 314, 762.
32. Gejyo, F., Homnea, N., Suzuki, Y., Arakama, M., *Serum levels of beta-2-microglobulin, a new form of amiloid protein in patients undergoing long term hemodialysis*, N. Engl. J. Med., 1986, 314, 585.
33. Hamsten, A., Wiman, B., de Faire, U., Blomback, M., *Increased plasma level of a rapid inhibitor of tissue plasminogen activator in young survivors of myocardial infarction*, N. Engl. J. Med., 1985, 313, 1557.
34. Harpel, P. C., Rosenberg, R. D., *Alpha—2—macroglobulin and antithrombin-heparin cofactor, modulators of hemostatic and inflammatory reactions*, Prog. Haemost. Thromb., 1976, 3, 145.
35. Harpel, P. C., *Proteinase inhibitors; A precarious balance*, N. Engl. J. Med., 1983, 309, 725.
36. Hirai, H., *CEA The development of laboratory tests for cancer in Japan* with *special reference to Earcinoembryonic proteins*, Antibiotics Chemother., 1978, 22, 67.
37. Hitzig, W., Schmidt, H., Betke, K., Rotschild, M., *Erythroleukämie mit hämoglobinopathie und Eisenstoffwechselstörung*, Helv. Ped. Acta., 1960., 15, 203.
38. Hoefler, H., Klingemann, H. G., Egbring, R., *Fibronectin and factor VIII RAg in acute and chronic hepatic failure*, in ; „*Factor XIII and fibronectin*", (Egbring, R., Klingemann, H. G. Ed.) Die Medizinische Verlagsgesellschaft, Marburg/Lahn, 1983, p. 269.
39. Hoffman, M., Fuchs, H. E., Pizzo, S. V., *The macrophage mediated regulation of hepatocyte synthesis of antithrombin III and alpha—1—proteinase inhibitor*, Thromb. Res., 1986, 41, 767.

40. Hormann, H., *Fibronectin-mediator between cells and connective tissue*, Klin. Wochenschr. 1982, 60, 1265.
41. Hynes, R. O., *Integrins; a farmily of cell surface receptors*, Cell, 1987, 48, 549.
42. Kamboh, M. I., *Biochemical and genetic aspects of human serum alpha—1—proteinase inhibitor protein*, Disease Markers, 1985, 3, 135.
43. Kazatchine, M., Hauptmann, G., Nydegger, U., *Techniques du complement, INSERM*, 1985.
44. Kazatchine, M., Nydegger, U., Fearon, D. T., *La voie alterné du complément, Nouv.* Press Med., 1979, 8, 2187.
45. Klingemann, H. G., Höfeler, H., Kosukavak, M., Havemann, K., *Fibronectin in acute leukemia*, in; „*Factor XIII and fibronectin*", (Egbring, R. G., Klingemann, H. G. Ed.), Die Medizinische Verlagsgesellschaft, Marburg/Lahn, 1983, p. 277.
46. Koie, K., Kamiya, T., Ogata, K., Takamatsu, I., *Alpha—2—plasmin inhibitor deficiency (Miyasato disease)*, Lancet, 1978, ii, 1334.
47. Küshner, I., Gewurtz, H., Benson, M. D., *C-reactive protein and the acute-phase response*, J., Lab. Clin. Med., 1981, 97, 739.
48. Küshner, I., Ribich, W. N., Blair, J. B., *Control of the acute phase response*, J. Lab Clin. Med., 1980, 96, 1037.
49. Kyle, R. A., *Bence Jones proteins, Pathophysiology of immunoglobulins, diagnostic and clinical aspects*, Alan R. Liss Inc., New York, 1984, p. 261.
50. Linneke, P., *Eiweisse*, Academie Verlag, Berlin, 1983.
51. Main, D. M., Mennuti, M. T., *Neural tube defects; issues in prenatal diagnosis and counselling*, Amer. J. Coll. Obstet. Gynecol., 1986, 67, 1.
52. Mavligit, G. M., Stickley, E. S., Cabanillas, F. F., *Diagnosis of leukemia and lymphoma in the central nervous system by beta—2—microglobulin determinations*, N. Engl. J. Med., 1980, 303, 718.
53. Millurrsky, A., Alpert, E., *Results and benefits of a maternal serum alpha-fetoprotein screening program*, JAMA, 1984, 252, 1438.
54. Minton, D. P., *CEA Results of a 400—Patients carcinoembryonic antigen second-look colorectal cancer study*, Cancer, 1985, 55, 1284.
55. McConnell, I., Munro, A., Waldemann, H., *The immune system*, Blackwell Sci. Publ. Oxford, 1984.
56. Messmore, H. L., *Natural inhibitors of the coagulation system*, Seminars Thromb. Haemostas, 1982, 8, 267.
57. Mollnes, T. E., Lea, T., Mellbye, O. J., Pahle, J., Grand, O., Harboe, M., *Complement activation in rheumatoid arthritis evaluated by C3d and the terminal complement complex*, Arthritis Rheum., 1986, 29, 715.
58. Moga, A., Hărăguş, S., Dudea, C., Marinca, E., Pitea, P., Macavei, E., *Contribuţii la geneza şi stadiile evolutive ale bolii lui Kahler*, Clujul Medical, 1958, 30, 11.
59. Moraru, I., *Immunologie*, Ed. Medicală, Bucureşti, 1984.
60. Müller-Eberhard, H. J., Schreiber, R. D., *Molecular biology and chemistry of the alternative pathways of complement*, Adv. Immunol., 1980, 29, 2.
61. Niculescu, F., Hugo, F., Rus, H. G., Vlaicu, R., Bhakdi, S., *Quantitative evaluation of the terminal C5b-9 complement complex by ELISA in human atherosclerotic arteries*, Clin. Exp. Immunol., 1987, 69, 477.
62. Niculescu, F., Rus, H. G., Vlaicu, R., *Immunohistochemical localization of C5b-9, S-protein, C3d and ApoB in human arterial tissues with atherosclerosis*, Atherosclerosis, 1987, 65, 1.
63. Owen, M. C., Brennan, S. O., Lewis, J. H., Carrell, R. W., *Mutation of antitrypsin to antithrombin*, N. Engl. J. Med., 1983, 309, 694.

64. Pahwa, R., Pahwa, S., O'Reilly, R., Good, R. A., *Treatment of immunodeficiency diseases-progress toward replacement therapy emphasizing cellular and macromolecular engineering*, Springer Semin. Immunopathol., 1978, 1, 355.
65. Papsioanou, D., Geggie, P., Klassen, I., *Study of serum beta-2-microglobulin levels in breast cancer patients*, Clin. Chem. Acta, 1979, 99, 37.
66. Peters, D. K., Lachmann, P. J., *The complement system in renal disease*, in ; „*Renal disease*" (Black, D., Jones, N. F., ED), Blackwell Sci. Publ., Oxford., 1979, p. 169.
67. Pochon, F., Farandon, V., Tourbez-Perrin, M., *Localization of the two proteinase binding sites in human alpha-2-macroglobulin*, J. Biol. Chem., 1981, 256, 547.
68. Pussell, B. A., Peake, P. W., Brown, M. A., Charlesworth, J. A., *Human fibronectin metabolism*, J. Clin. Invest., 1985, 76, 143.
69. Putzki, P., Student, A., Jablonski M., Heymann H., *Comparison of the tumor markers CEA, TPA and CA 19—9 in colorectal carcinoma*, Cancer, 1987, 59, 223.
70. Ragni, M. V., Lewis, J. H., Spero, J. A., Bontempo, F. A., *Plasma fibronectin level in clinical disease states and after cryoprecipitate infusion*, Thromb. Haemostas., 1984, 52, 321.
71. Revillard, J. P., Vincent, C., *La beta-2.microglobuline*, Nouv. Press. Med., 1976, 5, 2707.
72. Rose, N. L., Friedman, H., Fahey, J. L., „*Manual of clinical laboratory immunology*", Amer. Soc. Microbiol., Washington DC, 1986.
73. Rosen, P. S., Cooper, M. D., Wedgwood, R. J., *The primary immunodeficiencies*, N. Engl. J. Med., 1984, 311, 235, 300.
74. Rus, H. G., Niculescu, F., Nanulescu, M., Cristea, A., Florescu P., *Immunohistochemical localization of the terminal C5b-9 complement complex in children with glomerular diseases*, Clin. Exp. Immunol., 1986, 65, 66.
75. Rus, H. G., Niculescu, F., Constantinescu, E., Cristea A., Vlaicu, R., *Immunoelectron microscopic localization of the terminal C5b-9 complement complex in human atherosclerotic fibrous plaque*, Atherosclerosis, 1986, 61, 35.
76. Rus, H. G., Cucuianu, A. M., Galea, F., Cristea, A., Uza, G., Cucuianu, M. P., *Plasma fibronectin in peripheral arterial disease*, Rev. Roum. Med. Int., 1985, 23, 271.
77. Saba, T. M., Blumenstock, F. A., Scovill, V. A., Bernard, H., *Cryioprecipitate reversal of opsonic alpha-2-surface binding glycoprotein deficiency in septic surgical and trauma patients*, Science, 1978, 201, 622.
78. Salmon, S., *E. Myeloma and related disorders*, Clinics in Haematology, 1982, 11, 1.
79. Sakata, Y., Aoki, N., *Cross-linking of alpha-2-plasmin inhibitor to fibrin by fibrin stabilizing factor*, J. Clin. Invest., 1980, 65, 290.
80. Schur, P. H., *Complement and lupus erythematosus*, Arthritis Rheum., 1982, 25, 793.
81. Schur, P. H., *Inherited complement components abnormalities*, Ann. Rev. Med., 1986, 37, 333.
82. Siegenthaler, W., *Klinische Pathophisiologie*, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1982.
83. Simionescu, N., Simionescu, M., *The cardiovascular system*, in ; „*Histology. Cell and tissue biology*", (Weis, L. Ed.), Elsevier, New York, 1983, p. 371.
84. Spiegelberg, H. L., *Detection and subtyping of monoclonal immunoglobulins*, in ; „*Immunoassays in the clinical laboratory*", (Nakamura, R. M., Dito, W. R., Tucker, E. S. Ed.), Alan, R. Liss Inc. New York, 1979, p. 243.
85. Stenbjarg, S., *Inherited alpha-2-macroglobulin deficiency*, Thromb. Res., 1981, 22, 491.
86. Steinberg, W. M., Gelfand, R., Anderson, K., Glenn, J., Kurtmare, S. H., Sindelar, W. F., Toskes, P. P., *Comparison of the sensitivity and specificity of the CA 19—9 and carcinoembryionic antigen assays in detecting cancer of pancreas*, Gastroenterology, 1986, 90, 343.

87. Thomas, L., *Protein diagnostic*, Behring Institute, 1982.
88. Tschopp, J., Masson, D., Schäfer, S., Peitsch, M., Preissner, K. T., *The heparin binding domain of S-protein/vitronectin bind to complement component C7, C8 and C9 and perforin form cytolytic T-cells and inhibits their lytic activities*, Biochemistry, 1988, 27, 4, 4103.
89. Uza, G., Cristea, A., Cucuianu, M. P., *Increased level of the complement C3 protein in endogenous hypertriglyceridemia*, J. Clin. Lab. Immunol., 1982, 8, 101.
90. Vlaicu R., Niculescu, F., Rus, H. G., Cristea, A., *Immunohistochemical localization of the terminal C5b-9 complement complex in human aortic fibrous plaque*, Atherosclerosis, 1985, 57. 163.
91. Wegelius, O., Skrifvars, B., Anderson, L., *Rheumatoid arthritis terminating in plasmocytoma*, Acta Med. Scand., 1970, 187, 133.
92. Wepsic, H. T., Kirkpatrick, A., *Alpha-fetoprotein and its relevance to human disease*, Gastroenterology, 1979, 77, 787.
93. Williams, R. C., *Immune complexes in human disease*, Ann. Rev. Med., 1981, 32, 13.
94. Yamada, K. M., Olden, K., *Fibronectins — adhesive glycoproteins of cell surface and blood*, Nature, 1978, 275, 179.
95. Zychlinsky, A., Jong, S., Young, J. D., *Cytolytic mechanisms of the immune systeme*, Current Opinion in immunology, 1988, 1, 63.
96. Beutler, B., Cerami, A., *Cachectin; more than a tumor necrosis factor*, New. Engl. J. Med., 1987, 316, 379.
97. Castell, J. V., Gomez-Lechon, M. J., David, M., Andrus, T., Geiger, T., Trullenque, R., Fabra, R., Heinrich, P. C., *Interleukin-6 in the major regulator of acute phase protein synthesis in adult human hepatocyties FEBS—LETTERS*, 1989, 242, 237.
98. Appel, G. B., Blum, C. B., Kunis, C. L., Appel, A. S., *The hyperlipidemia of the nephrotic syndrome. Relation to plasma albumin concentration, oncotic pressure and viscozity*, New. Engl. J. Med., 1985, 312, 1544.

III. ENZIMELE ÎN PATOLOGIA CLINICĂ

(Valoarea și limitele diagnosticului enzimatic)

Determinările activităților enzimatice în umorile organismului sau în diverse țesuturi constituie un important mijloc pentru detectarea și urmărirea evoluției unor numeroase stări patologice.

Pentru înțelegerea modificărilor suferite de enzime în diverse boli este necesară o scurtă trecere în revistă a unor probleme cu caracter general privind noțiunea de enzimă, localizarea intracelulară a enzimelor, clasificarea și mecanismul de acțiune al enzimelor, factorii de care depinde viteza unei reacții enzimatice și principiile care stau la baza determinărilor enzimatice precum și mecanismele de activare, de degradare și de eliminare din organism a diverselor enzime. Sînt prezentate, de asemenea, cîteva noțiuni practice privind păstrarea serului utilizat pentru determinări enzimatice precum și posibilele surse de eroare.

III.1. DATE GENERALE PRIVIND ENZIMELE

Enzimele sînt proteine produse de celulele vii și dotate cu funcții catalitice specifice. Ele catalizează reacții chimice care, în lipsa lor, ar putea decurge doar foarte lent sau la temperaturi ridicate incompatibile cu viața. În calitatea lor de catalizatori, enzimele sînt dotate cu următoarele proprietăți: sînt eficiente în cantități mult mai mici decît substanțele pe care le transformă și care poartă denumirea de substrate; rămîn practic neschimbate la sfîrșitul reacției; nu modifică echilibrul unei reacții reversibile dar aceclerează viteza cu care acest echilibru este atins.

În calitatea lor de proteine, enzimele sînt dotate cu toate caracteristicile legate de structurile compușilor proteici și pot fi separate și purificate cu metodele utilizate în studiul proteinelor. O proprietate importantă a reacțiilor enzimatice care au loc în celulele vii *(in vivo)* este aceea de a fi susceptibile de o reglare biologică, putîndu-și crește sau limita activitatea în funcție de necesități. Întrucît aproape toate reacțiile biochimice sînt catalizate de enzime specifice, e de presupus că în organism vor acționa o multitudine de enzime și, de fapt, cercetările de biochimie au fost în măsură să detecteze și să izoleze noi și noi enzime. Așa, de exemplu, în 1973, Rodwell (35) menționa 1500 de enzime identificate pentru ca, în 1982, Adolph și Lorenz (1) să indice un nu-

măr de 2000 enzime descoperite dintre care 100 au fost obţinute în stare cristalizată. Greutăţile moleculare ale enzimelor variază între 12.700, în cazul ribonucleazei, şi 1.000.000 în cazul glutamat dehidrogenazei.

III.1.1. CLASIFICAREA ŞI NOMENCLATURA ENZIMELOR

Comisia pentru enzime a Uniunii Internaţionale de Biochimie a propus un sistem de denumire a enzimelor bazat pe următoarele criterii:

A. Enzimele sînt împărţite în 6 clase principale (vezi tabelul 3.1) în funcţie de tipul reacţiei catalizate.

B. Numele fiecărei enzime are două părţi. Prima parte indică substratul sau substratele asupra cărora acţionează enzima. A doua parte a denumirii indică tipul de reacţie catalizată iar la sfîrşit se adaugă sufixul *ază*.

C. Informaţii suplimentare necesare pentru precizarea naturii şi particularităţilor reacţiei catalizate pot fi date în paranteză.

D. Fiecare enzimă are un număr de cod. Acest număr caracterizează tipul de reacţie (prima cifră) eventuala la subclasificare (următoarele două cifre) şi enzima individuală (a patra cifră). Numărul de cod este precedat de iniţialele EC (Enzyme Commission).

Aşa de exemplu, creatinkinaza (CK) care catalizează reacţia:



$$\text{ATP} + \text{creatină} \xrightarrow{\text{CK}} \text{ADP} + \text{creatinfosfat}$$

ar avea ca denumire ştiinţifică: ATP: creatinfosfotransferază iar numărul de cod ar fi EC 2.7.3.2. (2 pentru clasa transferazelor, 7 pentru subclasa fosfotransferazelor, 3 pentru grupul de fosfotransferaze, avînd ca acceptor un radical nitrogen, şi 2 pentru locul enzimei în cadrul subgrupei.

Conform aceluiaşi principiu, o serie de enzime, determinate în mod curent în laboratorul clinic, aşa cum sînt transaminaza glutamic oxalacetică (GOT) sau transaminaza glutamic piruvică (GPT) ar deveni EC 2.6.1.1. L-aspartat-2-oxoglutarat aminotransferaza şi respectiv EC 2.6.1.2. L-alanin-2-oxoglutarat aminotransferaza iar lactatdehidrogenaza (LDH) s-ar denumi EC 1.1.1.27 L-lactat-NAD oxidoreductază.

Întrucît utilizarea denumirilor ştiinţifice amintite îngreunează comunicarea rapidă între secţiile clinice (incluzînd şi personal mediu) şi laborator, Comisia de Enzime a acceptat şi folosirea denumirilor „triviale" în practica clinică. Aceste denumiri se limitează la indicarea substratului urmat de sufixul ază (de exemplu, lipază, amilază) sau a substratului şi a tipului de reacţie (de exemplu lactatdehidrogenază). Întrucît aceste denumiri uzuale sînt înrădăcinate în patologia clinică, le vom utiliza pe întreg parcursul acestui capitol. De asemenea am redat în tabelul 3.2 prescurtările enzimelor cu aplicabilitate clinică.

Tabelul 3.1

Clasificarea şi nomenclatura enzimelor după recomandările Uniunii Internaţionale de Biochimie

Clasa	Reacţii catalizate	Exemple de subclase	Enzime (exemple ilustrative)	
			Denumirea ştiinţifică	Denumirea uzuală
1. Oxidoreductaze	Oxidarea unui substrat (S) concomitent cu reducerea altui (S′) S redus+S′oxidat→S oxidat++S′redus	1.1. Acţionind asupra grupării CH—OH	EC 1.1.1.1. Alcool-NAD oxidoreductază	Alcool dehidrogenază
		1—4 Acţionind asupra grupării CH—NH_2	EC 1.4.3.6. L-glutamat-NAD(P) oxidoreductază (dezaminantă)	Glutamat-dehidrogenază
2. Transferaze	Transferul unei grupări G de pe un substrat (S) pe un altul (S′) SG+S′→S+S′G	2—3 Aciltransferaze	EC 2.3.1.6. Acetil-CoA : colinoacetiltransferază	colinaciltransferază
		2—7 Fosfotransferaze	EC 2.7.1.1. ATP-D-hexozo-6-fosfotransferază	hexokinază
3. Hidrolaze	Hidroliza legăturilor ester, eter, peptid, glicozil, C—C, P—N, anhidridă acidă	3—1 Acţionind asupra legăturii ester	EC 3.1.1.8. Acilcolinacil-hidrolază	colinesterază
		3—2 Acţionind asupra grupării glicozil	EC 3.2.1.23. β-D-galactozid-galactohidrolază	β-galactozidază
4. Liaze	Îndepărtează grupări de pe substrat prin alt mecanism decit hidroliza, lăsind în loc duble legături	4—2 Carbooxigenliaze	EC 4.2.1.2. L-malathidroliază	fumarază
5. Izomeraze	Interconversiunea izomerilor	5—3 Interconversiunea aldolazelor şi cetozelor	EC 5.3.1.1. D-gliceraldehid-3-fosfat ketolizomeraza	triozofosfat izomeraza
6. Ligaze	Formarea legăturilor C—O, C—N, C—S intr-o reacţie cuplată cu degradare de ATP	6—3 Formarea legăturii C—N	EC 6.3.1.2. L-glutamat-amoniu-ligază	glutamin-sintetază

Tabelul 3.2

Prescurtări ale denumirilor enzimelor utilizate în diagnosticul de laborator

Prescurtarea utilizată	Denumirea uzuală (trivială) recomandată de EC	Eventuale denumiri utilizate în trecut, la care încă nu s-a renunţat	Numărul de cod EC
AcP	Fostafaza acidă	—	3.1.3.2.
AlP	Fosfataza alcalină	—	3.1.3.1.
ALD	Fructozo-bifosfat-aldolază	Aldolază	4.1.2.13
α-Amilază	α-Amilază	—	3.2.1.1.
ATP-ază	Adenozintrifosfatază	ATP-monofosfatază	3.6.1.3.
CHE	Colinesterază	Pseudocolinesterază	3.1.1.8.
CK	Creatinkinază	Creatinfosfokinază (CPK)	2.7.3.2.
GLDH	Glutamatdehidrogenază	Glutamicdehidrogenază	1.4.1.3.
GOT (AST)	Aspartataminotransferază	Transaminaza glutamic oxalacetică	2.6.1.1.
GPT (ALT)	Alaninaminotransferază	Transaminaza glutamic piruvică	2.6.1.2.
G_6P-DH	Glucozo-6-fosfat dehidrogenază	Dehidrogenaza esterului Robinson	1.1.1.49
γ- GT	γ-glutamiltransferază	γ Glutamiltranspeptidază	2.3.2.2.
α -HBDH	Lactatdehidrogenază izoenzima 1	α-hidroxibutirat dehidrogenază	1.1.1.27
ICDH	Isocitrat dehidrogenază	Isocitric dehidrogenaza	1.1.1.41
LAP	Aminopeptidază	Leucinaminopeptidaza	3.4.11
LDH	Lactat dehidrogenază	Lacticodehidrogenaza	1.1.1.27
SDH	L-iditol-dehidrogenază	Sorbitoldehidrogenaze	1.1.1.14

III.1.2. STRUCTURA ŞI MECANISMUL DE ACŢIUNE ALE ENZIMELOR

Perfecţionarea metodelor de separare a proteinelor (vezi pag. 37) a permis obţinerea unor preparate purificate de enzime cu un maxim de activitate specifică (unităţi enzimă/mg proteină) şi chiar în stare cris-

talizată. Utilizîndu-se tehnici, cum ar fi difracția razelor X de către un cristal de protein-enzimă și fotomicrografia electronică, alături de analiza chimică a compoziției în acizi aminați și în legătură cu determinări ale activității enzimei în funcție de producerea unor anumite modificări, în respectiva compoziție s-au făcut mari progrese în înțelegerea structurii și mecanismului de acțiune ale enzimelor (35).

Ca și în cazul oricărei alte proteine, enzimele prezintă o *structură primară* corespunzînd secvenței aminoacizilor în lanțul peptidic și o *structură secundară* dată de plierea lanțurilor polipeptidice în urma formării de legături transversale (disulfidice sau de hidrogen) între radicalii laterali ai lanțurilor amintite. *Structura terțiară* a unei proteinenzime se referă la posibilitatea aranjării lanțurilor răsucite de polipeptide într-o anumită ordine sub formă de straturi sau fibre menținute în contact prin forțe interatomice slabe (forțe Van der Waals). Asocierea unor subunități similare sau diferite sub formă de agregate conferă proteinei așa-zisa *structură cuaternară*.

Am prezentat aceste principii de organizare structurală a proteinelor spre a facilita înțelegerea modului în care substratul poate stabili legături cu diverșii radicali aminoacidici din structura enzimei, aranjați spațial în așa fel încît să constituie un *centru activ* la nivelul căruia are loc fixarea și modificarea moleculelor de substrat.

Așa de exemplu, în cazul colinesterazei, zona activă conține acid glutamic, serină și alanină. S-a sugerat că la nivelul acidului glutamic (radical acid COO^-) se fixează gruparea bazică a colinei ($—N^+(CH_3)_3$), în timp ce serina, prevăzută cu un oxidril, stabilește o legătură tranzitorie cu radicalul acid din structura substratului acilcolină. Se ajunge astfel la desfacerea legăturii ester a substratului iar produșii de hidroliză care rezultă, respectiv colina și acidul gras, părăsesc zona activă a enzimei, care poate fixa o nouă moleculă de acilcolină (vezi fig. 3.1). Ca un alt exemplu menționăm că în centrul activ al transglutaminazei (factorul XIII stabilizator al fibrinei) se găsește cisteina care, prin intermediul grupării SH, stabilește o legătură tioester (—CO—S) cu radicalul glutamină dintr-un monomer de fibrină. Într-o etapă următoare se desface legătura tioester stabilindu-se o legătură peptidică (—CO—NH—) între monomerul de fibrină desprins de pe enzimă și gruparea lizină a unui alt monomer de fibrină (1, 12, 35).

Natura acizilor aminați din structura unei enzime are importanță nu numai pentru determinarea centrului activ dar și pentru formarea unor complexe cu rol în procesul de activare al enzimei. Așa de exemplu, factorii coagulării II, VII, IX și X, avînd în centrul activ aminoacidul serină și numiți din acest motiv proteaze serinice, dependente de vitamina K, nu se pot activa în lipsa radicalilor — carboxiglutamici care nu intră în centrul activ dar care au rol de fixare a ionilor de calciu și implicit de formare a complexelor cu fosfolipidele și cu proteazele activatoare (14), permițînd activarea zimogenilor prin proteoliză limitată (vezi pag. 185).

Modificările conformaționale care afectează structura secundară, terțiară sau cuaternară a proteinenzimei, induse, de exemplu, prin căldură sau prin agenți oxidanți, duc la pierderea activității enzimatice. O serie de enzime conțin în structura lor și grupări neproteice (de ex. metale sau

a) 1) Acilcolină

$R-C(=O)-O-CH_2-CH_2-N^{+}(CH_3)_3$

OH (Ser) H_2O COO^- (Glu)

Colinesterază

2) $R-C(=O)-O-$Ser $HOCH_2-CH_2-N^{+}(CH_3)_3$ H_2O COO^- (Glu)

Colinesterază

3) $R-C(=O)-OH$ $HO-CH_2-CH_2-N^{+}(CH_3)_3$

OH (Ser) COO^- (Glu)

Colinesterază

b) 1) Monomer fibrină $-(CH_2)_2-C(=O)-NH_2$ HS$-$ XIIIa $\rightarrow$ NH_3 + Monomer fibrină $-(CH_2)_2-C(=O)-S-$ XIIIa

2) H_2N-Liz$-$ Monomer fibrină

Monomer fibrină $-(CH_2)_2-C(=O)-HN-$Liz$-$ Monomer fibrină

Fibrină stabilizată

Fig. 3.1. Exemple ilustrative privind structura centrului activ al enzimelor şi mecanismul de acţiune al acestora. a) *Colinesteraza serică* avînd în centrul activ o grupare anionică şi un radical serină. Etapele reacţiei: 1) alinierea substratului acilcolină la centrul activ al enzimei; 2) desfacerea legăturii ester a acilcolinei şi formarea temporară a unui ester între acidul gras şi radicalul serină din centrul activ al enzimei; 3) desprinderea colinei şi a acidului gras de pe suprafaţa enzimei. b) *factor XIII stabilizator al fibrinei* (transglutaminaze) avînd în centrul activ radicalul SH. Etapele reacţiei: 1) formarea unui tioester între f. XIII şi un monomer de fibrină; 2) stabilirea unei legături $-C(=O)-NH$ între doi monomeri de fibrină şi eliberarea XIII-a$-$SH.

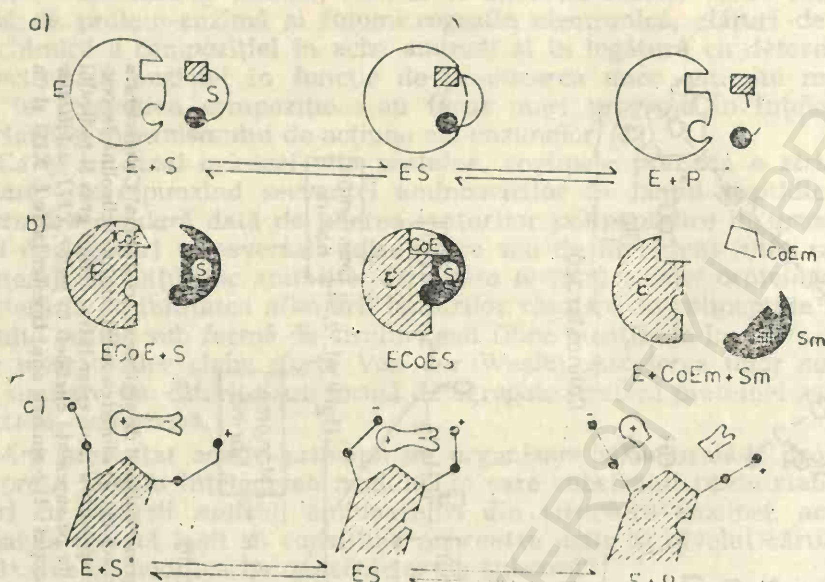


Fig. 3.2. Reprezentare schematică a formării complexelor enzimă substrat. E = enzimă; S = substrat; P = produs de reacţie; a) ipoteza tiparului rigid reprezentat de zona activă a enzimei în care substratul se potriveşte ca şi cheia în broască; b) formarea complexului enzimă-substrat este condiţionată de prezenţa coenzimei (CoE), iar la sfîrşitul reacţiei, substratul modificat (Sm) şi coenzima modificată (CoEm) se desprind de pe enzimă; c) ipoteza modificărilor conformaţionale ale enzimei în cursul fixării substratului.

vitamine) care sînt termostabile şi dializabile. Termenul de „grup prostetic“ utilizat pentru desemnarea acestor grupări neproteice tinde să fie înlocuit în literatura de specialitate cu cel de coenzimă. În acest fel sistemul enzimatic complet sau *holoenzima* constă din partea proteică *apoenzima* plus partea neproteică *coenzima* (1, 35).

Aşa cum se poate vedea din fig. 3.1 şi fig. 3.2, reacţia enzimatică poate fi concepută ca avînd loc în două etape: formarea complexului enzimă-substrat, urmată de modificarea substratului şi desprinderea produşilor de pe enzimă. (1, 35).

Zona activă a unei enzime nu trebuie concepută ca un tipar preformat şi rigid în care substratul se potriveşte ca şi cheia în broască. De fapt cercetările din ultimii ani au adus importante argumente în favoarea ipotezei lui Koshland după care zona activă a enzimei ar fi dotată cu oarecare flexibilitate astfel încît substratul poate induce modificări conformaţionale ale enzimei care ajunge „să se potrivească“ cu substratul (vezi fig. 3.2).

III.1.2.1. SPECIFICITATEA UNEI REACŢII ENZIMATICE

Spre deosebire de catalizatorii neproteici care accelerează o mare varietate de reacţii chimice, enzimele prezintă o *specificitate de reacţie* şi o *specificitate de substrat*. Prin specificitate de reacţie se înţelege ca-

pacitatea enzimelor de a cataliza doar un anumit tip de reacție (oxidoreducere, transfer, hidroliză etc.). Specificitatea de substrat este mai relativă în sensul că majoritatea enzimelor pot cataliza o anumită reacție acționînd asupra unor substrate înrudite din punctul de vedere al structurii. Așa de exemplu, colinesteraza hidrolizează o serie de esteri ai colinei (acetilcolină, butirilcolină, benzoilcolină etc.), avînd însă o afinitate deosebită față de butirilcolină care este hidrolizată mai rapid decît ceilalți esteri de colină și reprezintă un așa-zis substrat preferențial. De asemenea, fermentul fibrinolitic, plasmina, hidrolizează nu numai fibrina, dar și alte proteine cum ar fi cazeina, hemoglobina, factorii V și VIII ai coagulării precum și unii esteri sintetici ai argininei și lizinei (12, 35).

Dacă așa cum s-a arătat, specificitatea de substrat este oarecum relativă, *specificitatea de grup* este însă strictă, înțelegîndu-se prin aceasta faptul că o anumită enzimă acționează numai asupra unor grupări chimice particulare. Astfel, chimotripsina hidrolizează preferențial legăturile peptidice în care gruparea carboxil este dată de un acid aminat aromatic (fenilalanină, tirozină sau triptofan), iar trombina acționează numai asupra legăturilor peptidice dintre arginină și glicocol (12).

Există o *specificitate optică*, anumite enzime acționînd doar asupra izomerilor D (de exemplu, enzimele glicolitice) sau doar asupra izomerilor L (enzimele cu rol în metabolismul acizilor aminați) precum și o relativă specificitate de coenzimă (35).

Așa de exemplu, oxidoreductazele, care acționează în procesele de biosinteză, tind să utilizeze $NADPH_2$ ca reducător, în timp ce enzimele oxidoreductoare, cu rol important în procesele de degradare, utilizează de preferință NAD^+ ca oxidant (acceptor de hidrogen).

III.1.2.2. PRINCIPII DE DETERMINARE A UNEI ACTIVITĂȚI ENZIMATICE

Cantitățile extrem de mici de enzime din umorile organismului îngreunează măsurarea lor prin metode de dozare a proteinelor. Așa de exemplu, colinesteraza serică, o enzimă cu activitate relativ puternică (vezi tabelul 3.3) se găsește în cantități de abia 10 mg/l, iar factorul VII al coagulării, o protează serinică, dependentă de vitamina K și necesară pentru inițierea coagulării pe calea extrinsecă, se află în plasmă într-o concentrație de sub 1 mg/l. Din acest motiv dozarea enzimelor se bazează pe determinarea activității lor, adică pe capacitatea de a cataliza o anumită reacție. De fapt, în condiții optimizate, viteza unei astfel de reacții este proporțională cu cantitatea de enzimă prezentă în mediu.

Din cele arătate se poate considera că:

a) Exprimarea activității unei enzime se face pe baza vitezei reacției catalizate (adică cantitatea de substrat modificat pe unitatea de timp);

b) Pentru obținerea de rezultate corecte este necesară găsirea condițiilor optime de activitate a enzimei, respectiv a temperaturii optime, un pH optim, o concentrație adecvată a substratului și a eventualelor coenzime necesare precum și absența inhibitorilor (1).

Tabelul 3.3

Valori normale (pentru adulţi) ale activităţilor unor enzime serice cu importanţă diagnostică. Încercările de a echivala vechile unităţi cu U/l obţinute prin metode optimizate nu sînt recomandate.

Enzima	Valori normale		Alte unităţi folosite încă în unele laboratoare
	U/l	în sistemul Katal	
Aspartataminotransferaza (GOT, AST) „ (optimizat)	<12 U/l <16 U/l	<200 nKat/l <267 nKat/l	<33 u Wroblewski
Alaninaminotransferaza (GPT, ALT) „ (optimizat)	<12 U/l <18 U/l	<200 nKat/l <300 nKat/l	<33 U Wroblewski
Creatinkinaza (CK) „ (optimizat)	<50 U/l <80 U/l	<833 nKat/l <1333 nKat/l	
Lactatdehidrogenaza (LDH)	120–240 U/l	2000–4000 nKat/l	
α-Amilaza (substrat maltoheptoză) α-Amilaza (substrat amiloză)	<100 U/l 50–300 U/l	<1667 nKat/l 833–5000 nKat/l	<200 unităţi amilazice (*Smith*–Roe) <160 unităţi Somogyi < 50 unităţi Street-Close
Fosfataza alcalină „ (optimizat)	20–48 U/l 60–170 U/l	333–800 nKat/l 1000–2833 nKat/l	5–13 U King–Armstrong 2–4 U Bodansky
Fosfataza acidă (totală) „ (prostatică)	<11 U/l <4 U/l	<183 nKat/l <67 nKat/l	1–3 U King–Armstrong 0,1–0,9 U Bodansky
γ-glutamiltransferaza	4–21 U/l	67–350 nKat/l	
Colinesteraza (substrat acetilcolină) Colinesteraza (substrat butiriltiocolină)	1900–3800 U/l 3000–9300 U/l	31,7–63,3 μKat/l 50–155 μKat/l	150–250 μmol/ml/h (De la Huerga)
Glutamatdehidrogenaza (GLDH)	<4 U/l	<67 nKat/l	
Lipaza (substrat trioleină)	<200 U/l	<3333 nKat/l	

III.1.2.3. EXPRIMAREA REZULTATELOR. UNITĂȚI ENZIMATICE

Conform definiției date de către Uniunea Internațională de Biochimie, o unitate enzimatică (U) catalizează transformarea unui micromol de substrat în decurs de un minut în condițiile standard recomandate.

În laboratoarele clinice se obișnuiește ca activitatea enzimatică să se raporteze la 1 ml sau la 1 litru de ser sau plasmă. În consecință, exprimarea se poate face sub formă de mU/ml sau U/l. Din punct de vedere numeric, termenii de mU/ml sau U/l sînt identici, dar cel de U/l este mai frecvent utilizat.

În ultimii ani, se discută pe plan internațional adoptarea termenului de „Katal" ca unitate de activitate catalitică. În acest sens, un katal ar reprezenta activitatea enzimatică capabilă să transforme un mol de substrat în decurs de o secundă (kat = moli/sec). Este evident că pentru exprimarea activităților enzimatice investigate în laboratorul clinic se face raportarea la litru de plasmă sau ser iar, pe de altă parte, spre a se evita utilizarea numerelor subunitare se recurge la subunități ale katalului și anume microkatal (μKat) sau nanokatal (nKat). Transformarea din U/l în μKat/l se face împărțind U/l la 60 (1 minut = 60 secunde). Așa de exemplu, o activitate AST de 16 U/l devine 0,266 μKat/l și, respectiv, 266 nKat/l (1).

Acest mod de exprimare nu este însă unanim acceptat și în multe reviste de specialitate rezultatele sînt prezentate ca U/1.

În lipsa unor reactivi standard optimizați este iluzoriu să se vorbească de valori normale valabile pentru toate laboratoarele, întrucît mici modificări în tehnica de lucru produc variații mari ale valorilor activității enzimatice. Pentru orientare redăm în tabelul 3.3 valorile considerate ca normale în literatura de specialitate obținute, de regulă, cu reactivi optimizați, atrăgînd însă atenția că aceste valori nu trebuie absolutizate și că fiecare laborator clinic trebuie să-și stabilească valorile normale în condițiile de lucru care îi sînt accesibile.

III.1.2.4. FACTORI DE CARE DEPINDE VITEZA UNEI REACȚII ENZIMATICE

Dată fiind structura proteică a enzimelor, activitatea acestora este influențată de toți factorii care modifică starea coloidală a proteinelor. Astfel de factori sînt concentrația ionilor de hidrogen (pH), temperatura, natura chimică a tampoanelor utilizate și prezența în mediu a unor substanțe care denaturează proteinele.

Pe de altă parte, ținîndu-se seama de mecanismul reacțiilor enzimatice care implică formarea complexelor enzimă substrat (vezi fig. 3.2), este clar că viteza unor astfel de reacții depinde și de concentrația substratului, de prezența coenzimelor precum și de eventuala intervenție a unor inhibitori sau activatori.

Efecte dependente de pH. Ca orice proteine, enzimele prezintă la suprafața lor numeroase grupări ionizabile care pot reacționa cu ionii de H^+ sau OH^-. Prin urmare, orice modificare de pH se repercutează asupra stării de ionizare a moleculei de enzimă inclusiv a centrului său activ, ceea ce are influență asupra capacității sale de a fixa substratul. De notat că modificările de pH se pot repercuta și asupra stării de io-

nizare a substratului (35). Fiecare enzimă are un pH optim la care reacţia catalizată decurge cu viteză maximă. Pentru majoritatea enzimelor, acest pH este apropiat de cel fiziologic, situîndu-se între 6,9 şi 7.7. De notat însă că anumite reacţii enzimatice pot decurge pînă la capăt *in vitro* doar atunci cînd ionii de hidrogen formaţi în cursul reacţiei pot fi îndepărtaţi, respectiv doar dacă mediul este în domeniul alcalin. În astfel de reacţii, se foloseşte pH-ul optim al reacţiei şi nu cel al enzimei. Aşa de exemplu, activitatea optimă a colinesterazei decurge între pH 8 şi 9, asigurîndu-se astfel tamponarea acizilor eliberaţi prin hidroliza acilcolinei. Pe de altă parte, activitatea fenoloxidazică a ceruloplasminei decurge în condiţii optime la pH 5,5, iar cea a pepsinei la un pH mult mai acid, corespunzînd sucului gastric în perioada de stimulare a secreţiei.

Efectul temperaturii. Ca şi în orice reacţie chimică, viteza reacţiilor enzimatice se accelerează prin creşterea temperaturii. Peste o anumită limită de temperatură, denumită temperatură critică şi care variază de la enzimă la enzimă, componenta proteică se denaturează şi activitatea enzimatică încetează. Deşi inactivări evidente ale enzimelor survin, de regulă, la temperaturi de peste 60°C, un oarecare proces lent de denaturare începe deja la temperatura de 37—40°. Aceste observaţii i-au făcut pe unii enzimologi să recomande ca măsurătorile de activitate enzimatică *in vitro* să se facă la temperaturi de 30°C sau chiar la 25°C cînd, deşi reacţia decurge mai lent decît la 37°C, ea este perfect liniară (vezi fig. 3.3.). În orice caz, odată stabilită temperatura de lucru, este im-

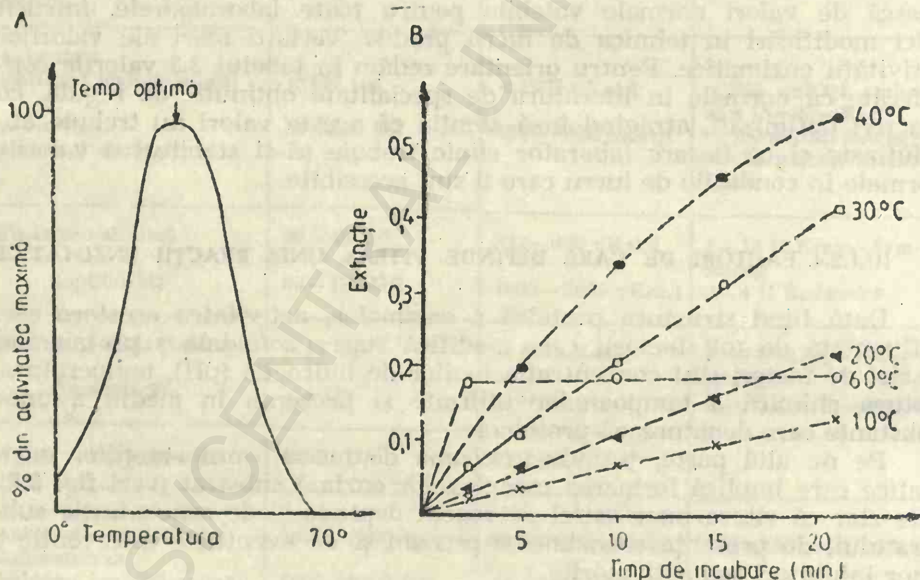


Fig. 3.3. A. Relaţia dintre temperatură (pe abscisă) şi activitatea enzimatică (în % din activitatea maximă pe ordonată). Creşterea iniţială este urmată apoi de o scădere a activităţii datorită inactivării enzimei. B. Dinamica unei reacţii enzimatice în funcţie de temperatură. Pe abscisă: timpul în minute; Pe ordonată: extincţia (dată de acumularea în mediu a produşilor de reacţie). Se poate vedea că la temperaturi sub 30°C, reacţia decurge liniar. La temperatura de 40°C, deşi iniţial reacţia este deosebit de rapidă, se constată deja o îndoire a curbei denotînd un oarecare grad de inactivare a enzimei cu trecerea timpului (1,35).

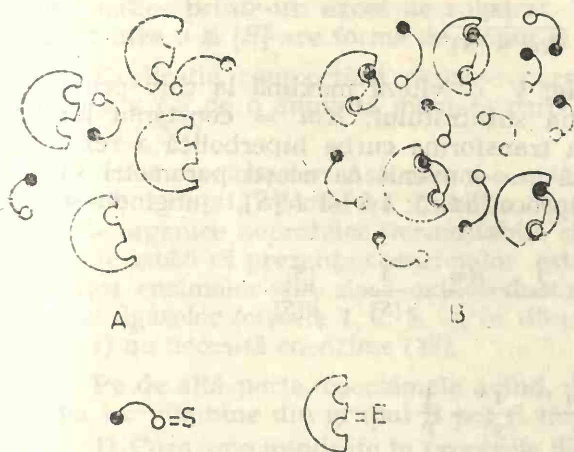


Fig. 3.4. Reprezentarea schematică a diferitelor rapoarte posibile între concentrația enzimei (E) și a substratului (S). După Rodwell (20) simplificată. A. La concentrații joase de substrat doar o parte din moleculele de enzimă fixează substratul iar activitatea enzimatică decurge neeconomic. B. La concentrații ridicate de substrat, toate moleculele de enzimă sînt combinate cu substratul, reacția decurgînd cu viteză maximală.

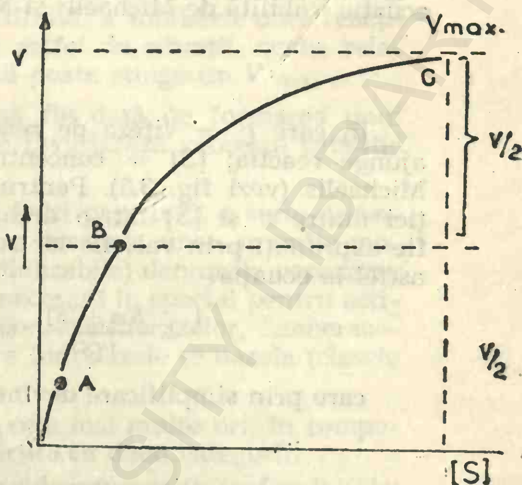


Fig. 3.5. Relația matematică dintre concentrația substratului (S) pe abscisă și viteza reacției enzimatice (*V*) pe ordonată. Se observă creșterea progresivă a *v* de la A la C odată cu creșterea [S] pînă la atingerea unei viteze maxime (*V*), după care o creștere în continuare a concentrației substratului nu mai accelerează viteza de reacție. Punctul B de pe curbă corespunde unei viteze egale cu jumătate din viteza maximală (respectiv *V*/2). Ducînd o perpendiculară din punctul B pe abscisă se poate afla constanta Michaelis (*Km*) reprezentînd concentrația de substrat la care $v = V/2$.

portant ca ea să fie respectată cu strictețe în cursul determinărilor. Amintim în acest sens că o creștere a temperaturii cu 1°C poate crește activitatea enzimatică cu +2,5 pînă la +20% în funcție de enzima determinată.

Este, de asemenea, important de știut că scăderea activității enzimatice la temperaturi joase nu se însoțește de modificări structurale și, respectiv, de o denaturare a enzimei. Dimpotrivă, stabilitatea structurii enzimei este promovată la rece și din acest motiv serurile, a căror activitate enzimatică urmează a fi testată, sau reactivii conținînd enzime se păstrează, de regulă, la +4°C iar în anumite cazuri particulare la temperaturi sub 0°C (1).

Efectul concentrației substratului. Așa cum reiese din fig. 3.4, șansele de formare a complexului enzimă-substrat sînt reduse în cazul unei concentrații joase de substrat și cresc progresiv o dată cu creșterea concentrației substratului. Paralel cu favorizarea formării complexului enzimă-substrat are loc și o accelerare a procesului catalitic, așa cum se poate vedea în fig. 3.5. Relația matematică dintre concentrația substratului și viteza unei reacții enzimatice a fost exprimată prin următoarea

ecuație stabilită de Michaelis și Menten:

$$v = \frac{V.[S]}{Km + [S]}$$

în care v = viteza de reacție; V = viteza maximă la care poate ajunge reacția; $[S]$ = concentrația substratului; Km = constanta lui Michaelis (vezi fig. 3.5). Pentru a transforma curba hiperbolică a relației dintre v și $[S]$ într-o dreaptă s-a convenit ca acești parametri să fie exprimați prin valorile lor reciproce, adică: $1/v$ și $1/[S]$, ajungîndu-se astfel la ecuația:

$$\frac{1}{v} = \frac{Km + [S]}{V[S]} \quad \text{sau} \quad \frac{1}{v} = \frac{Km}{V} \times \frac{1}{[S]} + \frac{[S]}{V[S]}$$

care prin simplificare devine:

$$1/v = \frac{Km}{V} \times \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V}.$$

Avîndu-se în vedere că doar v și $[S]$ sînt variabile, în timp ce Km și V sînt constante pentru o anumită pereche enzimă-substrat, ecuația de mai sus este de tipul $y = ax + b$, care dă o reprezentare grafică lineară, așa-zisa reprezentare dublu reciprocă imaginată de Lineweaver și Burk (vezi fig. 3.6).

Pe baza acestei relații și efectuînd 4—5 determinări de activitate enzimatică la concentrații diferite de substrat, se poate calcula constanta Michaelis (Km) care are importante aplicații practice, dînd indicații privitoare la concentrația optimă de substrat ce urmează a fi utilizată în determinările de rutină. De regulă, concentrația de substrat trebuie să fie cel puțin de zece ori mai ridicată decît valoarea lui Km.

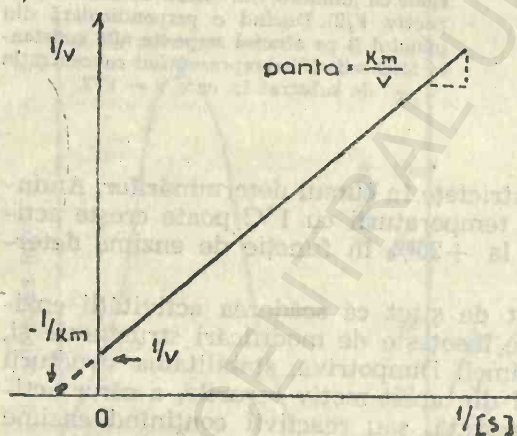


Fig. 3.6. Reprezentarea dublu reciprocă (Lineweaver-Burk) a relației dintre $1/[S]$ (pe abscisă) și $1/v$ (pe ordonată). Punctul în care dreapta intretaie ordonata constituie o măsură a valorii reciproce $1/V$, iar locul de întretăiere al abscisei reprezintă valoarea $-1/Km$. Prin utilizarea valorilor reciproce (vezi textul). se ajunge ca relația să poată fi reprezentată printr-o dreaptă care indică în ce măsură scăderea $[S]$ și deci creșterea valorii $1/[S]$ duce la o scădere a V, respectiv o creștere a valorii $1/v$.

Valoarea Km pentru diferite perechi de enzimă-substrat oscilînd între 10^{-2} și 10^{-5} mol/1, furnizează și relații cu privire la afinitatea unei enzime față de un substrat. Așa de exemplu, o valoare crescută a Km, indicînd că $V_{max}/2$ este atinsă doar la concentrații relativ ridicate de substrat, indică o afinitate redusă a enzimei față de substrat sau prezența unui inhibitor competitiv (vezi pag. 177). Invers, o valoare Km redusă indică o afinitate cres-

cută a enzimei față de substrat și, implicit, o viteză de reacție accelerată.

Menționăm și posibilitatea, mai rar întîlnită, a inhibării unei reacții enzimatice printr-un exces de substrat. În astfel de situații, curba relației dintre v și $[S]$ are formă de clopot și nu poate atinge un V_{max}.

Explicația comportării descrise pare să fie dată de formarea unui complex ES de o anumită manieră care nu favorizează procesul catalitic (vezi fig. 3.7).

Rolul coenzimelor. Așa cum s-a arătat (vezi pag. 168), o serie de enzime își exercită efectul lor catalitic doar în prezența unor anumite molecule organice neproteice (termostabile și dializabile) denumite coenzime. Se știe astăzi că prezența coenzimelor este necesară în special pentru activitatea enzimelor din clasa oxidoreductazelor, transferazelor, izomerazelor și ligazelor (clasele 1, 2, 5, 6), în timp ce hidrolazele și liazele (clasele 3 și 4) nu necesită coenzime (35).

Pe de altă parte, coenzimele avînd, de cele mai multe ori, în compoziția lor vitamine din grupul B pot fi împărțite în două categorii:

1) Coenzime implicate în procesele de oxidoreducere (transfer de H^+);
2) Coenzime implicate în transferul altor grupe decît H^+.

În prima grupă se includ nicotinadenindinucleotidul (NAD) și o formă fosforilată a acestuia (NADP) (conținînd în structura lor vitamina PP); riboflavinmononucleotidul (FMN) și flavinadenindinucleotidul (FAD), ambele conținînd, în structura lor, riboflavina (vit. B_2); tot în această grupă se includ acidul lipoic (acid 6-8-ditiooctanoic) care, prin grupările tiolice (—SH), poate deveni donator sau acceptor de H, precum și coenzima Q, o chinonă care intervine în procesele de fosforilare oxidativă.

Din a doua grupă de coenzime fac parte adenozintrifosfatul (ATP) și substanțele înrudite, precum și zaharidele fosfatate cu rol în transferul de grupări fosfat, vitamina B_1 (tiaminpirofosfat), cu rol în reacția de decarboxilare a acidului piruvic și vitamina B_6 (piridoxalfosfatul), cu rol în reacțiile de transfer a grupărilor amino (aminotransferaze) sau transaminare. Tot în această grupă se includ coenzima A, conținînd în structura ei acidul pantotenic și intervenind în transferul de radicali acetil, precum și acidul folic și vitamina B_{12}, cu rol în transferul grupărilor cu un atom de carbon, cum ar fi grupul formil (CHO), formiat (HCOOH) sau hidroximetil (CH_2OH).

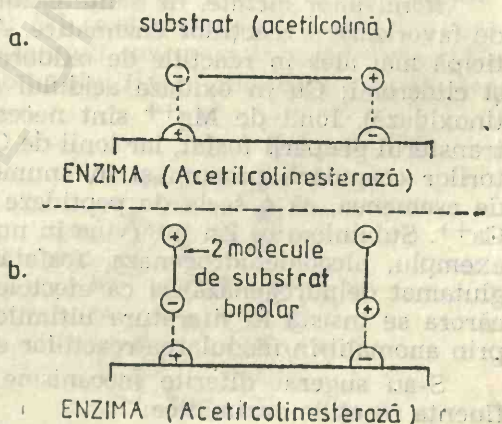
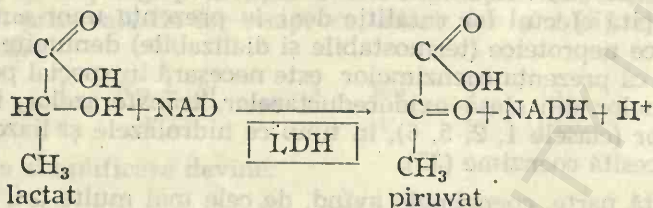
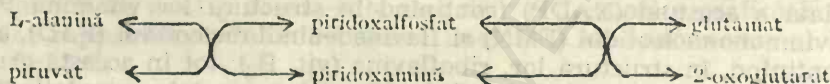


Fig. 3.7. Inhibiția unei reacții enzimatice prin exces de substrat, în cazul unei enzime cu un centru activ alcătuit dintr-o grupare anionică și una esterolitică (în acest caz acetilcolinesterază) și a unui substrat bipolar (acetilcolina): a) în cazul unor concentrații optime de substrat acesta se aliniază la centrul activ al enzimei putînd fi hidrolizat; b) în cazul unui exces de molecule bipolare de substrat va exista posibilitatea formării unor complexe în care substratul nu este aranjat în mod favorabil procesului de hidroliză.

Pentru înțelegerea mecanismului de acțiune al coenzimelor este important de reamintit că aceste substanțe pot fi considerate ca un al doilea substrat, respectiv un cosubstrat, suferind modificări concomitente cu substratul. Așa de exemplu, în reacțiile de oxidoreducere o moleculă de substrat se oxidează (se dehidrogenează), în timp ce o moleculă de coenzimă se reduce (se hidrogenează).



Mai menționăm că în reacțiile de transaminare, piridoxalfosfatul (vit. B_6) acționează ca un transportor intermediar al grupărilor amino între doi aminoacizi.



Rolul unor metale. În multe cazuri, diverse metale exercită un efect de favorizare a reacțiilor enzimatice. Așa de exemplu, Fe, Mo și Cu participă mai ales în reacțiile de oxidoreducere (Fe în catalază, peroxidază și citocromi; Cu în oxidaza acidului ascorbic și tirozinază; Mo în xantinoxidază). Ionii de Mg^{++} sînt necesari în toate reacțiile care asigură transferul grupării fosfat, iar ionii de Ca^{++} în procesele de activare a factorilor coagulării precum și în anumite procese de fosforilare. Se știe, de asemenea, că o serie de peptidaze sînt activate de Mn^{++}, Zn^{++} sau Ca^{++}. Subliniem că Zn intervine în numeroase alte reacții enzimatice (de exemplu, alcooldehidrogenaza, fosfataza alcalină, anhidraza carbonică, glutamat dehidrogenază) și că efectele carenței în oligoelemente, asupra cărora se insistă în literatura ultimilor ani, se exercită probabil tocmai prin anomalii în modularea reacțiilor enzimatice (1,35).

S-au sugerat diferite mecanisme prin care metalele ar putea influența reacțiile enzimatice:

1) Participarea directă a ionilor de metal în cataliză prin schimbări de valență în cursul reacției de oxidoreducere și a transportului de electroni (de exemplu, Fe în citocromi).

2) Formarea de complexe cu substratul (de exemplu, adevăratul substrat al reacției de fosfotransferare este complexul Mg^{++} ATP^{4-}).

3) Formarea unor metaloenzime care leagă apoi substratul într-un complex enzimă-metal-substrat (de exemplu, ionii de calciu asigură formarea unui complex între fosfolipide, enzima activatoare Xa și zimogenul activabil, respectiv protrombina care, în cazul de față, joacă rol de substrat.

4) Inducerea unor modificări conformaţionale care duc la activarea enzimei sau îi menţin o structură terţiară sau cuaternară activă (de exemplu Zn^{++} în alcooldehidrogenaza hepatică).

Metalele pot exercita însă şi efecte negative putînd transforma enzima într-o formă inactivă. Aşa de exemplu, grupările SH din centrul activ al transglutaminazei (factor XIII) pot fi blocate de către metale grele, cum ar fi Hg, ducînd la inactivarea consecutivă a enzimei (12).

Efectul inhibitorilor de enzime. În literatura de specialitate există tendinţa de a face o distincţie între aşa-zişii *„modificatori"* ai unei reacţii enzimatice, care pot fi reglatori fiziologici ai proceselor metabolice şi sînt reprezentaţi de molecule care survin în mod normal într-un organism viu, şi *„inhibitorii nefiziologici"*, respectiv moleculele străine, care afectează calitatea enzimei *in vivo* şi *in vitro*.

Din punctul de vedere al mecanismului de acţiune, toţi inhibitorii (fiziologici şi nefiziologici) pot fi împărţiţi în două mari grupe: *inhibitori competitivi* şi *inhibitori necompetitivi*. O altă modalitate de clasificare a inhibitorilor ţine seama de locul lor de acţiune, distingîndu-se inhibitori care acţionează asupra centrului activ al enzimei şi inhibitori alosterici care afectează funcţia enzimei acţionînd într-o altă zonă a moleculei de proteinenzimă.

Inhibitorii competitivi sînt substanţe cu structură chimică asemănătoare substratului (analogi chimici ai substratului) şi concurează cu acesta pentru ocuparea centrului activ al enzimei (zona catalitică). Astfel, în loc să se formeze complexul enzimă-substrat (ES), se formează un complex enzimă-inhibitor competitiv (EI) (vezi fig. 3.8). Ca urmare a acestei competiţii, şansele formării complexului ES scad şi implicit activitatea enzimatică se reduce. Dacă însă se creşte mult concentraţia substratului *[S]*, menţinîndu-se constant nivelul inhibitorului *[I]*, se amplifică şansele for-

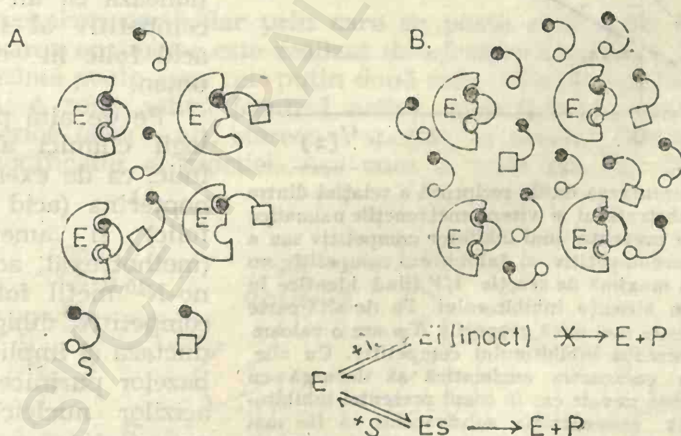


Fig. 3.8. Competiţia dintre substrat (*S*) şi inhibitorul competitiv (*I*) pentru centrul activ ai enzimei (*E*). A) În cazul unei concentraţii relativ reduse de substrat şansele inhibitorului (cu structură oarecum similară substratului) de a ocupa centrul activ al enzimei sînt mari. B) Aceste şanse ale inhibitorului competitiv se reduc mult o dată cu creşterea concentraţiei substratului.

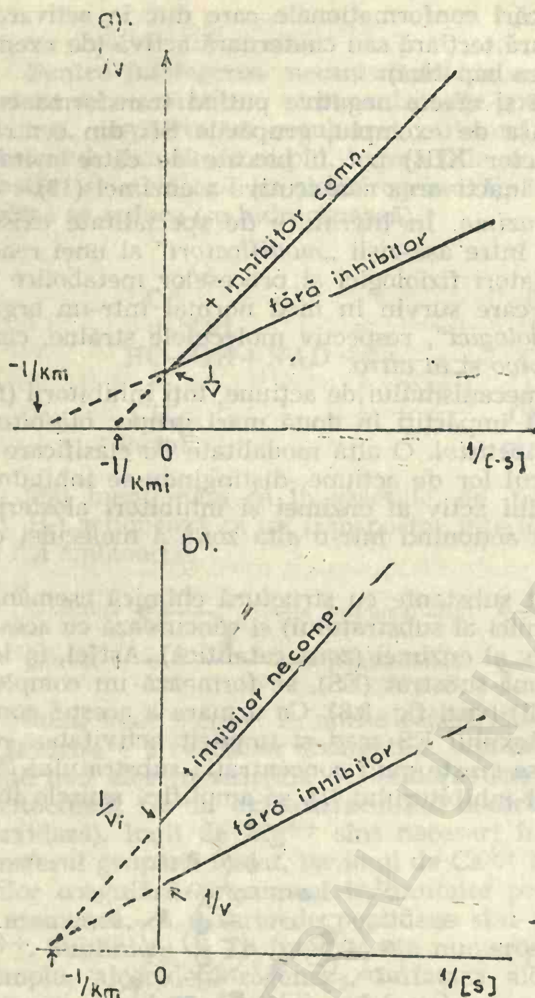


Fig. 3.9. Reprezentarea dublu reciprocă a relației dintre concentrația substratului și viteza unei reacțiie nzimatice în absența și în prezența unui inhibitor competitiv sau a unui inhibitor necompetitiv. a) Inhibitorul competitiv nu modifică viteza maximă de reacție $1/V$ fiind identice în prezența sau în absența inhibitorului. Pe de altă parte $1/Km$ are o valoare mai mică, respectiv Km are o valoare mai mare în prezența inbihitorului competitiv. Cu alte cuvinte pentru ca reacția enzimatică să decurgă cu aceeași viteză este nevoie ca, în cazul prezenței inhibitorului competitiv, concentrația substratului să fie mai mare. b) Inhibitorul necompetitiv nu modifică valoarea Km dar reduce viteza maximă $\frac{1}{Vi} > \frac{1}{V}$ respectiv $Vi < V$; așadar, în prezența inhibitorului necompetitiv, viteza de reacție este mai scăzută chiar dacă concentrația substratului crește atît de mult încît $1/[S]$ tinde către 0.

mării complexului *ES* iar efectul inhibitor diminuă. În astfel de condiții, viteza de reacție este aceeași ca și în lipsa inhibitorului, caracteristică fiind însă o creștere a valorii *Km* (vezi fig. 3.9). Ca exemplu de inhibitori competitivi se citează sulfamidele care sînt analogi chimici ai acidului para-aminobenzoic (vezi fig. 3.10). La o serie de microorganisme, acidul folic se formează pe cale enzimatică din acid p-aminobenzoic iar antagonizarea competitivă a acestui proces s-a dovedit a fi fatală pentru respectivele microorganisme. De notat că organismul uman este lipsit de enzimele necesare pentru formarea acidului folic din acid p-aminobenzoic, procurîndu-și acidul folic din alimente. Ca urmare, sulfamidele nu acționează ca un inhibitor competitiv al sintezei de acid folic în organismul uman.

Pe de altă parte, analogii chimici ai acidului folic, ca de exemplu aminopterina (acid 4-aminofolic) și amethopterina (methotrexat, acid 4 amino-N^{10}-metil folic) inhibă competitiv dihidrofolatreductaza și implicit sinteza bazelor purinice și deci a acizilor nucleici. Efectul antimitotic și respectiv cel antitumoral al antagoniștilor acidului folic își găsesc astfel o explicație prin mecanismul amintit al inhibiției competitive.

Un alt exemplu al inhibiției competitive este dat de fizostigmină care inhibă acetilcolinesteraza datorită structurii sale similare cu acetilcolina. Există, de asemenea, dovezi că dicumarinicile inhibă coagularea datorită structurii lor oarecum asemănătoare cu vitamina K. Aceste „antivitamine K" se substituie vitaminei menționate în sistemul enzimatic al carboxilazei hepatice care, în condiții normale (adică în prezența vitaminei K), duce la formarea radicalilor γ-carboxiglutamici cu rol în fixarea calciului și necesari pentru ca factorii II, VII, IX și X ai coagulării să devină activabili (12, 14).

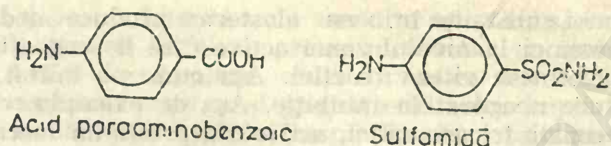


Fig. 3.10. Analogia între structura chimică a acidului paraaminobenzoic și cea a unei sulfamide.

Lista inhibitorilor competitivi cu importanță pentru medicina clinică este destul de lungă. Amintim doar că recent descoperiții inhibitori ai HMG-CoA reductazei, și deci ai sintezei de colesterol, acționează tot printr-un mecanism competitiv avînd o structură similară cu β-hidroxi-β-metil glutaril-CoA, substratul enzimei amintite (vezi și pag. 71).

Inhibitorii necompetitivi nu au o structură similară cu substratul și nu concurează cu acesta pentru ocuparea zonelor active ale enzmei. Efectul unor astfel de inhibitori nu diminuă prin creșterea substratului și, în consecință, valoarea *Km* nu este afectată, în timp ce *Vmax* este diminuată (vezi fig. 3.9). Se cunosc inhibitori necompetitivi reversibili care se pot desprinde de pe enzimă și inhibitori necompetitivi ireversibili care constituie adevărate „otrăvuri" ale enzimelor. Între aceștia din urmă se numără iodoacetamida, săruri ale metalelor grele (Ag^{++}, Hg^{++}), agenți oxidanți etc. (35).

Un mecanism particular prin care se poate ajunge fie la inhibiția fie la activarea enzimelor este realizat de *efectorii alosterici*. S-a constatat că o enzimă poate avea cel puțin două zone diferite capabile să fixeze metaboliții: o zonă activă (centrul activ), care fixează substratul, și o zonă alosterică (alos = alt; stereos = spațiu), la nivelul căreia se poate fixa un modificator al reacției. Așa cum se vede din fig. 3.11, fixarea

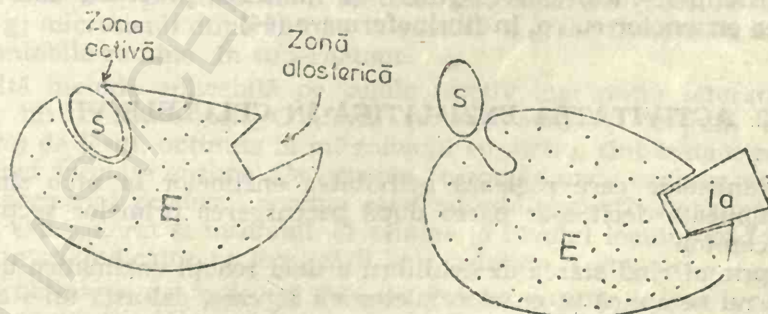


Fig. 3.11. Reprezentarea schematică a inhibiției alosterice. Pătrunderea inhibitorului *I* în zona alosterică modifică afinitatea enzimei *E* față de substratul *S*.

unei substanțe în zona alosterică produce modificări conformaționale ale enzimei la nivelul zonei active care îi scad afinitatea față de substrat și încetinesc viteza reacției. Așa cum s-a arătat, mecanismul alosteric nu duce neapărat la inhibiție. Așa de exemplu, citratul, rezultat din ciclul acizilor tricarboxilici, activează, printr-un mecanism alosteric, acetil-CoA carboxilaza, stimulînd biosinteza de acizi grași, și totodată inhibă alosteric fosfofructokinaza, limitînd procesul de glicoliză. Experiențe *in vitro* au reușit să producă prin tratarea cu mercuriale, uree sau enzime proteolitice modificări structurale ale proteinenzimei limitate la zona alosterică. În astfel de condiții, enzima își pierde sensibilitatea față de efectorul alosteric, păstrîndu-și activitatea catalitică (35).

Importanța pentru medicină a inhibitorilor de enzime prezintă aspecte multiple. Pe lîngă exemplele arătate cu implicații farmacologice, mai amintim că variatele proteaze din sînge sînt menținute sub control datorită prezenței unor cantități apreciabile de inhibitori plasmatici ai proteazelor (vezi pag. 94). Inhibitori ai proteazelor se găsesc și în parazitul intestinal Ascaris care rezistă astfel acțiunii proteolitice a sucurilor digestive. Fasolea, soia și albușul de ou crud conțin, de asemenea, inhibitori ai proteazelor, ceea ce le diminuă digestibilitatea.

Administrarea pe cale parenterală a enzimelor provenite de la o specie diferită duce la apariția de anticorpi care inactivează enzima administrată. Acest fenomen limitează utilizarea enzimelor ca agenți terapeutici. Așa de exemplu, terapia cu L-asparaginază a leucemiilor nu poate fi repetată datorită mecanismului amintit, iar repetarea terapiei cu streptokinază, un activator al plasminogenului, se poate solda cu accidente anafilactice.

În ultimii ani, s-a descris și posibilitatea formării de autoanticorpi față de unele enzime. Astfel, apariția de inhibitori imunoglobulinici față de factorul XIII al coagulării a fost semnalată la unii pacienți tratați cu izoniazidă și se bănuiește că acest medicament ar fi putut modifica structura factorului XIII care devine antigenic și induce formarea de anticorpi (24).

Deși imunoglobulinele care alcătuiesc „anticoagulantul lupic" și care apar uneori în cursul lupoeritomatovisceritei, reacționează cu fosfolipidele electronegative și nu în mod direct cu enzimele implicate în coagulare, în ultimă instanță acest efect se repercută asupra formării complexelor fosfolipide-factori ai coagulării și limitează procesele care duc la activarea enzimelor cu rol în fibrinoformare (44).

III.2. ACTIVITATEA ENZIMATICĂ ÎN CELULELE VII

Mecanismele care reglează activitatea enzimelor *in vivo* sînt mult mai complicate decît s-ar părea după parcurgerea primelor secțiuni ale acestui capitol.

În primul rînd starea de echilibru a unei reacții enzimatice urmărite *in vitro* nu se aplică în cazul celulelor vii în care, datorită unei anumite orientări spațiale, produsul de reacție este mereu îndepărtat din jurul enzimei și, ca urmare, reacția $E+S \rightleftharpoons ES \rightleftarrows E+P$ este deplasată spre stînga. De multe ori produsul unei reacții enzimatice devine substrat într-o altă

reacție enzimatică și așa mai departe, datorită unei anumite orientări spațiale a respectivelor enzime, asigurînd astfel un proces metabolic cu mai multe secvențe enzimatice. Astfel de complexe multienzimatice sînt cele care asigură glicoliza citoplasmatică, precum și grupul enzimelor implicate în ciclul acizilor tricarboxilici și al lanțului respirator, cu localizare mitocondrială.

În al doilea rînd, reacțiile enzimatice din celulele vii sînt supuse unor mecanisme de reglare dependente de hormoni sau de metaboliți celulari specifici cu efecte locale limitate (prostaglandine, AMP-ciclic, derivați de fosfatidilinozitol).

În al treilea rînd, celulele vii își pot crește sau limita activitățile enzimatice prin modificarea numărului de molecule de enzimă sintetizate de către respectivele celule.

Pe baza considerentelor menționate este necesară deci o scurtă trecere în revistă a datelor privind distribuția intracelulară a enzimelor și a noilor achiziții privind mecanismele celulare de reglare a activităților enzimatice.

III.2.1. DISTRIBUȚIA INTRACELULARĂ A ENZIMELOR

Datele actuale de citologie subliniază importanța aranjamentului spațial și a compartimentării enzimelor, substratelor și cofactorilor în interiorul celulei. Cunoașterea localizării enzimelor la nivelul diferitelor organite celulare este necesară nu numai pentru o mai bună înțelegere a felului în care sînt dirijate procesele metabolice dar și pentru interpretarea unor rezultate furnizate de laboratorul clinic. Apare astfel logic să se considere că o leziune celulară, care duce la eliberarea din celule a enzimelor mitocondriale, este mai gravă decît o leziune limitată de membrana celulară și care duce doar la ieșirea enzimelor citoplasmatice (1, 2, 37).

Localizarea intracelulară a enzimelor poate fi studiată pe baza separării diverselor organite și componente celulare prin centrifugare diferențială, după ruperea membranei celulare. Astfel, celulele intacte, nucleii celulari și detritusurile celulare sedimentează în urma unei centrifugări la 600 x g pe timp de 5 minute; mitocondriile după 30 min la 10.000 x g; microsomii după 60 min la 100.000 x g, iar fracțiunea solubilă nesedimentabilă rămîne în supernatant.

O altă metodă aplicabilă pe celule relativ mai puțin alterate este aceea a histoenzimologiei. Conform acestei metode, secțiuni subțiri (2—10 μm) de țesut, obținute la microtomul cu răcire, sînt tratate cu substratul unei anumite enzime. Ca urmare, în zonele unde enzima este prezentă se formează produsul reacției catalizate de respectiva enzimă. Dacă produsul este colorat și insolubil, el rămîne la nivelul locului de formare și servește ca indicator al localizării intracelulare a enzimei.

Prin obținerea de anticorpi față de diverse enzime se pot încerca și detectări cu ajutorul metodelor de imunofluorescență sau imunoperoxidază. Astfel de tehnici se bazează pe supoziția că anticorpul marcat cu fluoresceină sau cu peroxidază este în măsură să pătrundă pînă la nivelul

la care este localizată enzima antigen. Este evident că aceste tehnici sînt indicate mai ales pentru detectarea enzimelor ancorate la suprafața celulelor și mai puțin pentru cele localizate în organite.

Prin diversele metode amintite s-a putut demonstra că enzimele glicolitice (LDH, aldolaza, hexokinaza) sînt localizate în citoplasmă, pe cînd alte enzime, și mai ales cele afectate ciclului acizilor tricarboxilici (de exemplu, piruvat dehidrogenaza, isocitrat dehidrogenaza, α-cetoglutarat dehidrogenaza etc.), precum și glutamatdehidrogenaza (GLDH) se găsesc în mitocondrii. Tot în mitocondrii sau mai precis pe membrana internă a acestor organite se găsesc enzimele lanțului respirator și cele implicate în fosforilarea oxidativă. Apropierea în spațiu a dehidrogenazelor ciclului acizilor tricarboxilici și a enzimelor respiratorii asigură refacerea oxidativă a coenzimelor (NAD, NADP) care au fixat hidrogenul desprins de pe substrat în cursul proceselor de dehidrogenare.

De notat că alaninaminotransferaza (ALT, GPT) se găsește localizată doar în citoplasmă (enzimă uniloculară) pe cînd aspartataminotransferaza (AST, GOT), ca și malicodehidrogenaza (MDH) pot fi evidențiate atît în citoplasmă cît și în mitocondrii (enzime biloculare).

De fapt, cercetări recente bazate pe tehnici imunochimice au putut face o diferențiere între aspartataminotransferaza mitocondrială (mAST) și cea citoplasmatică (c-AST), iar creșterea în ser a mAST (mGOT) ar implica un prognostic mai rezervat atît în boli hepatice cît și în infarctele miocardice (2).

La nivelul lizosomilor se găsesc incluse enzime cu rol în degradarea lipidelor, proteinelor și acizilor nucleici (colesteril-esterhidrolază acidă, dezoxiribonuclează, fosfatază acidă, proteaze, colagenaze, β-glicuronidază etc.). Cît timp membrana lipoproteică a lizosomilor rămîne intactă, enzimele lizosomale nu atacă substratele din citoplasmă. Dezintegrarea acestei membrane este însă urmată de liza celulei. Lizosomii nu trebuie însă considerați ca „saci de sinucidere" ai celulelor, întrucît sechestrarea în lizosomi și liza ulterioară a unor componente lezate ale celulei sau a unor particule lipoproteice internalizate (vezi pag. 36) contribuie mai degrabă la menținerea celulei decît la degradarea ei.

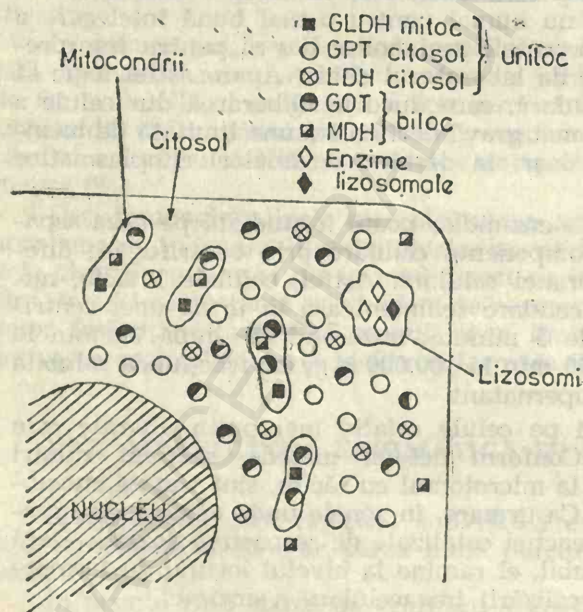


Fig. 3.12. Reprezentarea schematică a localizării intracelulare a enzimelor.

Echipamentul enzimatic al celulelor diferă nu

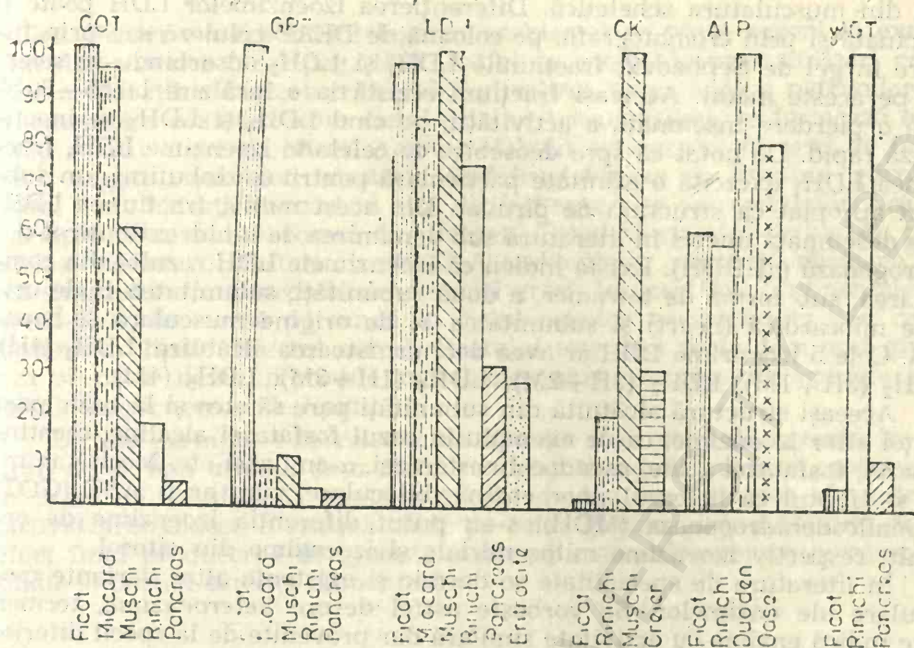


Fig. 3.13. **Distribuţia relativă în diverse ţesuturi a unor enzime celulare cu importanţă diagnostică. Concentraţia maximă a unei anumite enzime pe gram de ţesut este cotată cu 100%.**

numai în funcţie de localizarea în diverse organite, dar şi în funcţie de organul din care provin. Aşa de exemplu, GOT (AST) se găseşte în cantităţi similar de crescute în miocard şi ficat şi în cantităţi cu ceva mai reduse în fibra musculară scheletică, în timp ce GPT şi SDH se găsesc mai ales în ficat, iar CPK mai ales în musculatura scheletică şi în cantităţi cu ceva mai reduse în fibra miocardică (1, 36). Pe de altă parte, activitatea LDH este similar de ridicată în cele trei organe menţionate (vezi fig. 3.13). Provenienţa activităţii enzimatice în ser poate fi evaluată prin analizarea componenţei izoenzimelor.

III.2.2. VARIANTE ALE ENZIMELOR. IZOENZIME

Izoenzimele sînt forme moleculare distincte din punctul de vedere fizic al unei aceleiaşi activităţi catalitice (1, 35, 36). Pe baza proprietăţilor fizice diferite, izoenzimele pot fi diferenţiate şi eventual separate. Astfel de proprietăţi sînt încărcarea electrică şi implicit migrarea electroforetică diferită, comportare diferită la cromatografie pe schimbători de ioni, susceptibilitate diferită la diverse procedee de inactivare (căldură, agenţi chimici).

Aşa de exemplu, lacticodehidrogenaza (LDH) din ser poate fi separată electroforetic în cinci fracţiuni diferite (LDH_1, LDH_2, LDH_3, LDH_4, LDH_5). Fracţiunile cu migrare rapidă (LDH_1, LDH_2) sînt de provenienţă miocardică, iar fracţiunile lente (LDH_4, LDH_5) provin mai ales din ficat şi par-

țial din musculatura scheletică. Diferențierea izoenzimelor LDH poate fi efectuată și prin cromatografie pe coloană de DEAE-celuloză sau prin filtrare în gel de Sephadex, fracțiunile LDH_1 și LDH_2 adsorbindu-se selectiv pe aceste medii. Aceleași fracțiuni rezistă la o încălzire la 55—60°C fără o pierdere însemnată a activității, pe cînd LDH_4 și LDH_5 se inactivează rapid. De notat că spre deosebire de celelalte izoenzime LDH, fracțiunea LDH_1 exercită o afinitate particulară pentru α-oxobutirat, un substrat apropiat ca structură de piruvat. Din acest motiv, fracțiunea LDH_1 este desemnată uneori în literatură sub denumirea de α-hidroxilbutirat dehidrogenază (αHBDH). Există indicii că izoenzimele LDH rezultă din combinarea, sub formă de tetramer, a două subunități, subunitatea H de origine miocardică (heart) și subunitatea M de origine musculară și hepatică. Cele 5 izoenzime LDH ar avea deci următoarea alcătuire: LDH_1 (4H), LDH_2 (3H+1M), LDH_3 (2H+2M); LDH_4 (1H+3M), LDH_5 (4M).

Aceeași structură alcătuită din subunități pare să stea și la baza existenței altor izoenzime, ca de exemplu în cazul fosfatazei alcaline, creatinkinazei, fosfatazei acide, pseudocolinesterazei, α-amilazei etc. Merită amintit și faptul că în cazul unor enzime biloculare, cum ar fi AST (GOT) și malicodehidrogenaza (MDH), s-au putut diferenția izoenzime de organit, respectiv izoenzime mitocondriale și izoenzime din citosol.

În literatura de specialitate se descrie și existența altor variante moleculare ale enzimelor. Se vorbește astfel despre *heteroenzime*, termen care indică enzime cu activitate similară dar provenite de la specii diferite (de exemplu, LDH uman și LDH de iepure). Astfel de heteroenzime pot fi diferențiate prin tehnici imunologice.

Mai importante pentru patologie sînt așa-zisele *aloenzime* reprezentînd variante determinate genetic ale enzimelor și izoenzimelor și survenind doar la unii din membrii unei specii. Mutațiile care duc la formarea de aloenzime survin relativ destul de frecvent dar de cele mai multe ori nu dau naștere la manifestări patologice. Dacă însă modificările suferite de enzimă sînt de natură a-i afecta funcționalitatea, se dezvoltă o serie de anomalii cu caracter genetic afectînd diverse metabolisme (vezi pag. 226).

III.2.3. REGLAREA ACTIVITĂȚILOR ENZIMATICE

Se cunosc pînă în prezent trei mecanisme principale prin care se reglează activitatea enzimelor din organism în funcție de necesități: un prim mecanism este cel alosteric menționat anterior (vezi pag. 179); un al doilea mecanism general constă din posibilitatea enzimelor de a trece din formă inactivă de zimogen în formă activă; cel de al treilea mecanism depinde de capacitatea celulelor de a sintetiza noi molecule de enzime.

III.2.3.1. EFECTORII ALOSTERICI

Acești reglatori sînt produși de metabolism, acționează ca semnale, care, printr-un mecanism de feed-back, sînt în măsură să moduleze nu numai activitatea sistemelor enzimatice care i-au produs dar și alte căi meta-

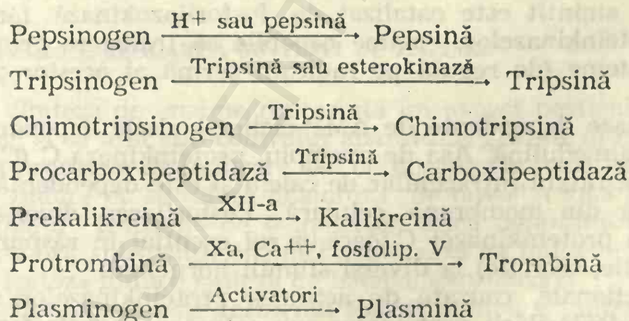
bolice. Pentru o mai bună înțelegere a problemei se poate reveni la exemplul dat anterior (vezi pag. 180). Astfel în condițiile unei utilizări crescute a hidraților de carbon pe calea glicolizei, urmată de o pătrundere a fragmentelor rezultate spre ciclul acizilor tricarboxilici, se formează cantități relativ mari de citrat. Acest metabolit acționează, în sens de feed-back negativ, inhibînd alosteric fosfofructokinaza și limitînd glicoliza astfel încît hidrații de carbon sînt dirijați spre alte căi metabolice, ca de exemplu stocarea sub formă de glicogen. Totodată citratul activează, prin același mecanism alosteric, acetil-CoA-carboxilaza, o enzimă cheie pe calea sintezei extramitocondriale de acizi grași. În acest fel, fragmentele de acetil-CoA, în loc să pătrundă în ciclul acizilor tricarboxilici, iau calea sintezei de lipide. Efectul net al citratului este deci acela de a opri glicoliza și de a devia procesele metabolice spre stocarea de energie sub formă de glicogen și de lipide.

Un alt exemplu este relevat de situația unei stări de carență în hidrați de carbon urmată de o utilizare crescută a grăsimilor și producerea în exces de acetil-CoA. Acest metabolit devine un activator alosteric al piruvatcarboxilazei, o enzimă cheie pe calea gluconeogenezei avînd drept efect final producerea de glucoză necesară sistemului nervos și compensîndu-se parțial carența alimentară.

III.2.3.2. FORMAREA DE ENZIME ACTIVE DIN PRECURSORI INACTIVI

Procesul de transformare a zimogenilor în enzime ridică probleme deosebit de complexe.

În cazul unor anumite enzime proteolitice cu rol în digestie sau în hemostază, activarea se face prin așa-zisul *proces de proteoliză limitată*. De fapt, astfel de enzime sînt produse și secretate sub formă de precursori (proenzime sau zimogeni) și poartă denumiri alcătuite din atașarea prefixelor *pre* și *pro* sau a sufixului *ogen* la numele enzimei active. Conversia proenzimelor în enzime active este catalizată fie de enzime proteolitice fie de H^+, ca de exemplu:


Pepsinogen $\xrightarrow{H^+ \text{ sau pepsină}}$ Pepsină
Tripsinogen $\xrightarrow{\text{Tripsină sau esterokinază}}$ Tripsină
Chimotripsinogen $\xrightarrow{\text{Tripsină}}$ Chimotripsină
Procarboxipeptidază $\xrightarrow{\text{Tripsină}}$ Carboxipeptidază
Prekalikreină $\xrightarrow{\text{XII-a}}$ Kalikreină
Protrombină $\xrightarrow{\text{Xa, } Ca^{++}\text{, fosfolip. V}}$ Trombină
Plasminogen $\xrightarrow{\text{Activatori}}$ Plasmină

Așa cum se poate vedea din exemplul de mai sus, activarea pepsinogenului și tripsinogenului poate fi catalizată de către însăși forma activă a enzimei iar un astfel de proces, denumit autocatalitic, decurge cu o viteză crescîndă pe măsură ce tot mai multe molecule de zimogen devin enzime cu capacitate de a activa.

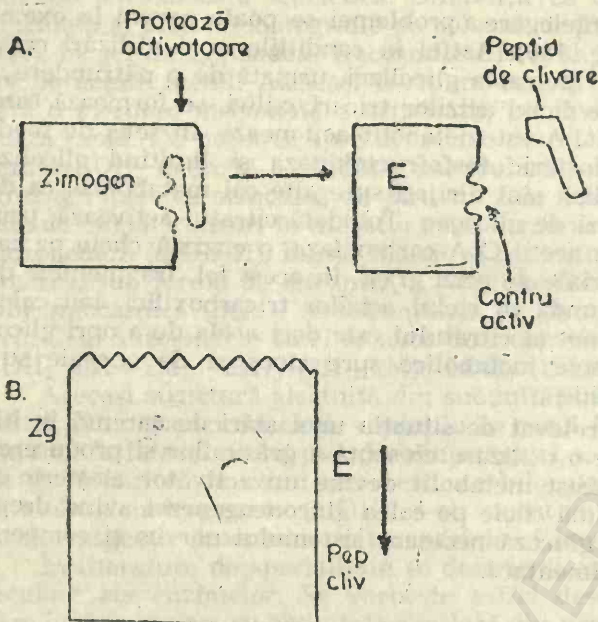


Fig. 3.14. Activarea zimogenilor spre enzime active prin mecanismul proteolizei limitate: A) prin scindarea unui peptid de clivare din molecula de zimogen se demască centrul activ al enzimei. B) electroforeza în gel de poliacrilamidă conținînd dodecilsulfat de sodiu (SDS) permite separarea, în funcție de greutatea moleculară și demonstrează desprinderea peptidelor de clivare (pep. cliv.) și reducerea greutății moleculare a enzimei *E* față de zimogenul (*Zg*) din care provine.

Procesul de activare prin proteoliză limitată implică hidroliza unor legături peptidice, îndepărtarea unor așa-zise peptide de clivare (de activare) și „demascarea" consecutivă a centrului activ al enzimei (Fig. 3.14). Este evident că prin îndepărtarea peptidelor amintite, greutatea moleculară a enzimei este mai redusă decît cea a zimogenului precursor. Așa de exemplu, pepsinogenul are o GM de 42.000 în timp ce pepsina are abia 34.500. De asemeni, GM a procarboxipeptidazei se reduce de la 96.000 la 34.300 în cursul activării spre carboxipeptidază, iar plasminogenul cu o GM de 92.000 trece în plasmină activă cu o GM de 83.000.

Un alt exemplu de activare a enzimelor este reprezentat de *fosforilarea precursorilor inactivi*. Fosforilaza, enzima care inițiază procesul de glicogenoliză se transformă din forma inactivă de fosforilază-b în formă fosforilată activă, denumită fosforilaza-a (fosfo-fosforilază). Procesul amintit este catalizat de fosforilazokinază făcînd parte din grupul proteinkinazelor, enzime capabile să transfere grupări fosfat pe diverse proteine (de regulă pe radicalii serină ai acestor proteine).

Există proteinkinaze dependente de AMP-ciclic și altele dependente de complexul Ca^{++}-calmodulină. Așa de exemplu, proteinkinaza C (C kinaza) este activată de fluxul intracelular de calciu și este dependentă de prezența fosfolipidelor din membrana celulară. Fosforilarea diverselor proteine sub acțiunea proteinkinazei C joacă un rol esențial în răspunsurile celulelor (contracție, secreție) la diverși stimuli hormonali.

Modificările funcționale, cauzate de acțiunea proteinkinazelor sînt tranzitorii, datorită defosforilării proteinelor sub acțiunea unor fosfoproteinfosfataze (care și ele pot fi activate de Ca^{++}, calmodulină sau AMP-ciclic). Așa de exemplu, fosforilaza a activă trece în forma b inactivă sub acțiunea unei fosfofosforilazofosfataze (vezi fig. 3.15).

Este demn de relatat faptul că anumite enzime, ca de exemplu glicogensintetaza, se inactivează prin fosforilare. Așa se face că în urma

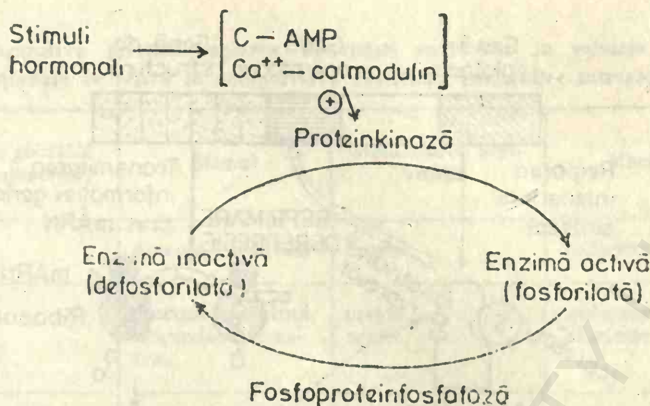


Fig. 3.15. Activarea enzimelor prin fosforilarea precursorilor inactivi. Explicația in text.

stimulării hepatocitelor cu glucagon și a eliberării mesagerului intracelular, reprezentat de c-AMP, are loc activarea unei proteinkinaze care fosforilează atît fosforilaza-b, trecînd-o spre forma activă de fosforilază-a, cît și glicogensintetaza care devine inactivă. Rezultanta finală a acestor procese este o creștere marcată a eliberării de glucoză din depozitele de glicogen (32).

Cercetări din ultimii ani au evidențiat posibilitatea modulării activității proteinkinazelor pe cale hormonală prin intermediul fluxului intracelular de calciu și a formării de c-AMP ca și sub acțiunea unor substanțe produse de celule și avînd rol local limitat în procesele de autoreglare (autocoizi). Astfel de substanțe sînt prostaglandinele, precum și diacilglicerolul și inozitoltrifosfatul, rezultate din scindarea fosfatidilnozitolilor din membranele celulare sub acțiunea fosfolipazei C. Este de așteptat ca aprofundarea acestor aspecte să contribuie la o mai bună înțelegere a mecanismelor prin care diverșii stimuli se transformă în activități celulare specifice (32).

III.2.3.3. REGLAREA SINTEZEI DE ENZIME

Sinteza de enzime reprezintă un aspect particular al sintezei de proteine, și se află sub controlul aparatului genetic al celulelor, realizîndu-se prin procesele de inducere sau de derepresie (vezi fig. 3.16).

Inducerea se referă la sinteza „de novo" a unei proteine ca răspuns la semnalul transmis de o moleculă mică denumită inductor. De fapt, de multe ori, substratul enzimei acționează ca inductor al acesteia (de exemplu lactoza induce sinteza de betagalactozidază).

Derepresia este termenul folosit pentru a indica sinteza „de novo" a unei proteine ca răspuns la absența din mediu a unei molecule mici specifice, denumită corepresor. Adeseori produșii reacției catalizate de o anumită enzimă acționează în calitate de corepresori limitînd sinteza respectivei enzime. Așa de exemplu, sinteza triptofansintetazei de către E-coli este reprimată de prezența în mediul de cultură a triptofanului, adică a

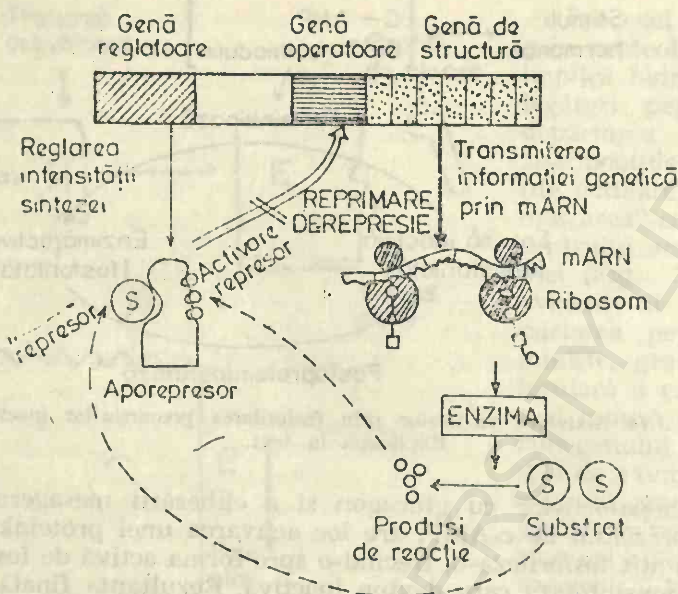


Fig. 3.16. Mecanismul de reglare a sintezei de enzime. Prezenţa în celulă a substratului (*S*) face ca represorul să se inhibe astfel incît sinteza de enzimă se dereprimă. Pe de altă parte, produşii de reacţie activează represia şi opresc transmiterea informaţiei genetice spre ribosomi şi implicit reduc sinteza de enzimă.

produsului reacţiei catalizate de triptofansintetază. Absenţa din mediu a triptofanului, adică a corepresorului, duce la creşterea sintezei de triptofansintetază. De asemenea, aşa cum s-a arătat anterior (vezi pag. 24), acumularea de colesterol în celule reprimă producţia de HMG-CoA-reductază, iar scăderea concentraţiei de colesterol stimulează producerea enzimei menţionate.

Creşterea activităţii enzimatice, cauzată de un proces de inducere sau derepresie, se manifestă doar după un interval de timp necesar sintezei de proteinenzimă şi bineînţeles că poate fi oprită de către agenţii care blochează sinteza proteinelor (cloramfenicol, actinomicina D, puromicina).

Deşi mecanismul inducerii de enzime a fost descris iniţial la microorganisme, există astăzi suficiente dovezi că acest mecanism este activ şi la animalele superioare, avînd un rol esenţial în reglarea metabolismelor. S-a putut, de asemenea, arăta că un inductor poate stimula sinteza mai multor enzime înrudite, respectiv implicate în acelaşi lanţ metabolic şi că nu numai diversele substrate dar şi o serie de hormoni pot îndeplini funcţia de inductori. Aşa de exemplu, glucoza şi insulina induc sinteza enzimelor implicate în utilizarea glucozei (glucokinaza, fosfofructokinaza, piruvatkinaza, glucozo-6-fosfat-dehidrogenaza) sau în formarea de glicogen (glicogensintetază). Totodată glucoza şi insulina reprimă enzimele

Tabelul 3.4

Cîteva exemple ilustrative privind reglarea activității enzimelor în celulele vii. Modificările menționate se referă la comportarea activității enzimatice intracelulare

Enzime cu rol în glicoliză glicogeneză și glicogenoliză,	Stimul	Modificarea activității	Mecanism
Glucokinaza	glucoză+insulină	crește	inducere
Fosfofructokinaza ,,	glucoză+insulină acumulare de citrat	crește scade	inducere alosterie
Glicogensintetaza ,,	glucoză+insulină adrenalină, glucagon cAMP	crește scade	inducere trecere în formă inactivă (inactivare prin fosforilare)
Fosforilaza	adrenalină, glucagon, cAMP	crește	trecere în formă activă (activare prin fosforilare)
Enzime cu rol în gliconeogeneză Piruvat carboxilaza ,, ,,	glicocorticoizi insulina Acetil-CoA	crește scade crește	inducere represie alosterie
Fosfoenolpiruvatcarboxikinaza ,,	glicocorticoizi insulina	crește scade	inducere represie
Enzime cu rol în lipogeneză Acetil-CoA carboxilaza ,,	insulină citrat	crește crește	inducere alosterie
HMG-CoA reductaza ,,	acumulare de colesterol în celulă drenaj biliar	scade crește	represie derepresie
Enzime cu rol în metabolismul acizilor aminați Diverse aminotransferaze (transaminaze) ,,	glicocorticoizi insulină	crește scade	induce represiere

cu rol în gluconeogeneză, a căror sinteză este stimulată însă de hormonii glucocorticoizi (35).

Nu trebuie uitat însă că nivelul unei activități enzimatice depinde nu numai de gradul de activare al enzimei sau de ritmul de sinteză al

acesteia, dar și de intensitatea proceselor de degradare a moleculelor de enzimă.

Reproducem în tabelul 3.4 cîteva exemple ilustrative privind situații care duc la modificarea activității unor enzime și mecanismele implicate în producerea respectivelor modificări.

III.2.3.4. IMPLICAȚII MEDICALE ALE INDUCERII DE ENZIME MICROSOMALE

În ultimii ani se constată o accentuată sporire a interesului pentru procesul de inducere enzimatică, ca urmare a observațiilor privind rolul inductor al unei serii întregi de chimicale care sînt introduse în organism în cantități mereu crescînde din cauza abuzului de medicamente sau prin contaminarea alimentelor.

Lista agenților inductori este lungă și în continuă proliferare. Ea include medicamente anticonvulsivante (fenobarbital, fenitoină) antiinflamatorii (aminopirina, fenilbutazona), antifungice (griseofulvina), antibiotice (rifampicina), anticoagulante (warfarina), agenți de adicție (alcool și marijuana), produse industriale (bifenili policlorinați și polibromați, dioxan), contraceptive orale (progesteron), pesticide (DDT), hidrocarburi policiclice (din fumul de țigară, din carnea la grătar).

Inducerea sub acțiunea agenților mai sus amintiți are loc mai ales la nivelul ficatului, dar acest proces a putut fi demonstrat și la nivelul placentei, al mucoasei intestinului subțire și al limfocitelor (18).

Un prototip al inducerii de enzime este *sistemul microsomal de hidroxilare a medicamentelor*, sub acțiunea căruia diversele substanțe străine organismului (xenobiotice) își sporesc grupările hidroxil și devin astfel mai hidrosolubile și mai ușor de eliminat pe cale renală sau biliară. Funcționarea acestui sistem, cunoscut și sub denumirea de sistem al oxidoreductazelor microsomale cu funcțiuni mixte, implică intervenția oxigenului molecular din care un atom este utilizat pentru hidroxilarea medicamentului iar celălalt atom este utilizat pentru generarea de H_2O cu hidrogenul de pe $NADPH_2$ sau, mai rar, $NADH_2$. La asigurarea fluxului de electroni necesari pentru reducerea atomului de oxigen contribuie citocromoxidoreductaza C (EC 1.6.99.3) și un grup de citocromi dintre care mai bine caracterizați sînt citocromii P_{450} și P_{448} (denumiți astfel după lungimea de undă de 450 nm și respectiv 448 nm la care prezintă un maxim de absorbție). Citocromul P_{450} intervine mai ales în hidroxilarea barbituricelor, iar citocromul P_{448} în hidroxilarea hidrocarburilor aromatice. Detalii asupra mecanismului biochimic prin care acționează sistemul microsomal de hidroxilare a medicamentelor pot fi găsite în articole de sinteză profilate pe această problemă (18). Considerăm însă necesară sublinierea anumitor aspecte cu implicații biologice mai deosebite:

a) Sistemul amintit este capabil să producă nu numai hidroxilări dar și demetilări, deetilări, dezaminări și dehalogenări (sistem al oxidazelor microsomale cu funcții mixte).

b) Metabolizarea unui medicament sau carcinogen nu duce implicit la scăderea efectului său biologic ci, dimpotrivă, în unele cazuri, îl poate potența.

c) Sistemul amintit hidroxilează nu numai diverse medicamente și xenobiotice dar și unii compuși endogeni importanți cum sînt hormonii steroizi, acizii biliari și chiar hemul (care trece prin biliverdină spre bilirubină).

d) Detoxificarea la nivelul ficatului se poate efectua și prin alte mecanisme biochimice ca de exemplu prin glicuronoconjugare sau sulfoconjugare, care nu implică în mod necesar o prealabilă hidroxilare.

e) Diverșii inductori și în special fenobarbitalul induc nu numai enzimele sistemului de hidroxilare și, respectiv, citocromul P_{450}, dar și alte enzime, ca de exemplu glicuroniltransferaza și γ-glutamiltransferaza. Acest fenomen se asociază cu o creștere generalizată a sintezei proteinelor microsomale și respectiv cu o amplificare a reticulului endoplasmatic.

f) Amploarea fenomenului de inducere enzimatică depinde de factorii genetici, de vîrstă (mai redus la vîrstnici), de factori hormonali (cortizonul avînd un efect permisiv), de alimentație și de graviditate.

Prezența unui proces de inducere a enzimelor microsomale se poate depista cu ajutorul unor indicatori cum ar fi de exemplu creșterea eliminărilor urinare de 6-β-hidroxicortizol și de acid D-glucaric precum și prin creșterea activității γ-glutamiltransferazei serice și prin accelerarea eliminării din organism a antipirinei (18). Inducerea de enzime are o serie de consecințe importante pentru practica medicală.

1). În primul rînd sporirea accentuată a capacității de hidroxilare are drept urmare o metabolizare și implicit o eliminare mai rapidă nu numai a preparatului care a cauzat procesul de inducere a sistemului enzimatic dar și a altor medicamente. Așa de exemplu, timpul de înjumătățire în plasmă a tolbutamidei, warfarinei, aminopirinei și antipirinei este evident scurtat la pacienții care consumă în mod cronic barbiturice precum și la alcoolicii care nu prezintă insuficiență hepatică.

2). În cursul terapiei cronice cu anticonvulsivante (fenobarbital, fenitoină) se poate ajunge la fenomene de osteoporoză, explicabile printr-o hidroxilare și respectiv o inactivare mai rapidă a vitaminei D_3.

3). Inducerea prin fenobarbital a bilirubinglicuroniltransferazei accelerează procesul de glicuronoconjugare a bilirubinei și are efecte favorabile asupra hiperbilirubinemiilor indirecte (neonatale, boala Gilbert, sindrom Criggler-Najjar tip II). În același sens, stimularea cu fenobarbital a sistemelor enzimatice care intervin în hidroxilarea acizilor biliari duce la creșterea solubilității în apă a acestora și implicit la amplificarea fluxului biliar apos cu repercusiuni favorabile asupra fenomenelor de colestază.

4). Agravarea porfiriilor în urma consumului de barbiturice s-ar putea explica prin mecanismul inducerii citocromului P_{450} cu structură heminică. Se ajunge astfel la o utilizare crescută și la o scădere consecutivă a rezervelor intracelulare de hem care constituie un precursor al citocromului și funcționează totodată ca represor al deltaaminolevulininicsintetazei, o enzimă cheie în porfirinogeneză. Cu alte cuvinte, inducerea prin fenobarbital a citocromului P_{450} duce în mod indirect la o derepresie a sintezei de porfirine care se produc astfel în exces.

5). Creșterea prin mecanism de inducere a γ-glutamiltransferazei serice și în mai mică măsură a fosfatazei alcaline serice la bolnavii tratați în mod cronic cu barbiturice sau cu alți agenți inductori poate crea dificultăți în interpretarea acestor teste de laborator și pretează la confuzii cu modificările produse în hepatopatiile colestatice sau în metastazele hepatice.

6). S-a arătat că o serie de hidrocarburi policiclice îşi sporesc efectul carcinogen prin hidroxilare, în timp ce hidrocarburile aromatice devin mai puţin cancerigene în urma hidroxilării. În consecinţă, inducerea sistemului microsomal de hidroxilare cu fenobarbital poate fie accelera, fie încetini creşterea tumorală în funcţie de carcinogenul implicat. Aceste date experimentale sugerează că interrelaţiile dintre inducerea de enzime (condiţionată genetic) şi carcinogeneză ar putea constitui un domeniu fructuos de cercetare în viitorul apropiat.

7). S-a încercat şi stabilirea unei legături între inducerea de enzime şi hipertrigliceridemie. De fapt, injectarea intraperitoneală repetată de fenobarbital la iepuri a produs o creştere a trigliceridelor serice şi hepatice concomitent cu amplificarea activităţii unor enzime microsomiale ca aminopirin-N-demetilaza, γ-glutamiltransferaza şi fosfatidatfosfohidrolaza (fosfataza acidului fosfatidic). Activitatea acestei ultime enzime creşte şi mai mult în ficatul animalelor la care s-a reuşit producerea unei hipertrigliceridemii prin administrarea unei diete bogate în fructoză (23). Pe de altă parte, subiecţii cu hipertrigliceridemie (tip II b şi IV) prezintă o creştere a nivelului plasmatic al mai multor enzime şi proteine secretate de ficat cum ar fi colinesteraza, lecitincolesterol-aciltransferaza (LCAT) precum şi o serie de enzime cu rol în coagulare. Chiar şi nivelele serice ale alaninaminotransferazei (GPT) şi γ-glutamiltransferazei sînt moderat dar semnificativ mai crescute la subiecţii hipertrigliceridemici (8, 27, 29).

Totodată la subiecţii cu hiperlipoproteinemie tip IV se constată valori semnificativ crescute ale procesului de clearance al antipirinei (vezi fig. 3.17). S-ar părea deci că accelerarea secreţiei hepatice de VLDL şi de diverse enzime şi proteine de export la astfel de

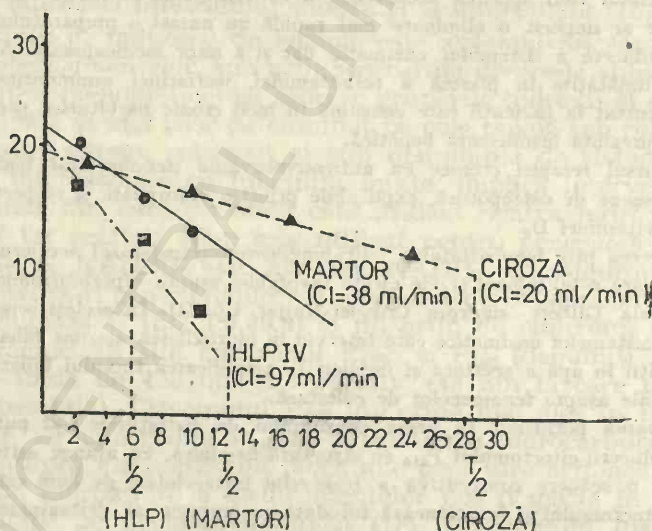


Fig. 3.17. Explorarea funcţiei sistemului microsomal de hidroxilare prin evaluarea procesului de clearance al antipirinei. Pe abscisă timpul în ore ; pe ordonată concentraţia de antipirină în salivă în μ/mgl (reprezentare logaritmică). Se poate vedea că eliminarea antipirinei din umorile organismului este lentă (T/2 prelungit,) iar valoarea de clearance este diminuată la bolnavul cu ciroză hepatică ; pe de altă parte, în comparaţie cu subiectul de control, subiectul cu hiperlipoproteinemie tip IV se caracterizează printr-o accelerare marcată a proceselor implicate în eliminarea antipirinei.

subiecți se întovărășește de o amplificare a reticulului endoplasmatic și de o activitate sporită a enzimelor microsomale cu rol în metabolizarea medicamentelor (3).

Conform unor date recente (26) s-ar părea însă că relația dintre procesul de inducere și metabolismul lipidic este mult mai complexă decît s-a crezut. S-a demonstrat de fapt că deși fenobarbitalul stimulează sinteza hepatică de colesterol și de trigliceride, el sporește și secreția de HDL (26) cu efect de protejare față de ateroscleroză (vezi pag. 38).

Se ridică astfel problema ca unii agenți să stimuleze preferențial sinteza de HDL iar alții să faciliteze sinteza și secreția de VLDL. Nu se poate exclude nici ipoteza unui tip de răspuns diferit al hepatocitelor la un același agent inductor. De fapt, alcoolul produce în unele cazuri o creștere a HDL iar în alte cazuri și în alte doze favorizează dezvoltarea hipertrigliceridemiei. Autorul s-ar considera mulțumit dacă expunerea destul de fragmentară a acțiunii va fi în stare să trezească atenția cititorilor asupra importanței, în plină expansiune, a patologiei legate de inducerea enzimatică.

III. 3. BAZELE FIZIOPATOLOGICE ALE DIAGNOSTICULUI ENZIMATIC

În condițiile fiziologice, majoritatea proceselor enzimatice ca și reglarea acestor procese au loc la nivelul celulelor, iar laboratorul clinic încearcă să contribuie la diagnostic și la stabilirea prognosticului pe baza determinărilor de enzime efectuate în umori și mai ales în serul sanguin. Deși s-au făcut eforturi pentru a se determina diversele activități enzimatice în triturate de țesuturi, ajungîndu-se pînă la analiza conținutului în enzime a organitelor celulare, aceste tehnici sînt încă greu de aplicat în laboratorul clinic. Nu trebuie uitat nici faptul că aplicarea pe scară largă a determinărilor de enzime din fragmentele de țesuturi obținute prin biopsie poate constitui un deziderat al cercetătorilor dar nu și al bolnavilor. Din aceste motive în cele ce urmează este abordată problema diagnosticului enzimatic, pe baza, în primul rînd, a datelor furnizate de dozarea activităților enzimatice în ser sau plasmă.

III.3.1. PROVENIENȚA ENZIMELOR PLASMATICE

În vederea interpretării corecte a rezultatelor furnizate de dozarea activităților enzimatice în ser sau plasmă este important să se cunoască locul de producere a diverselor enzime, mecanismele prin care diversele enzime ajung din celule în sînge, precum și căile și viteza de eliminare a enzimelor ajunse în plasmă.

Din punctul de vedere al mecanismului prin care enzimele ajung în plasmă și implicit din punctul de vedere al semnificației diagnostice, enzimele pot fi clasificate în următoarele categorii:

a) *Enzime secretate activ în plasmă*, mai ales de către ficat, și care acționează, de regulă, asupra unor substrate din plasmă îndeplinind aici un rol fiziologic. Astfel de enzime specifice plasmei sînt denumite și enzime plasmatice funcționale. Între acestea se includ lecitin: colesterolaciltransferaza (cu rol de esterificare a colesterolului plasmatic (vezi

pag. 33), precum și enzimele cu rol în coagularea sîngelui, în stabilizarea fibrinei și în procesul de fibrinoliză. Deși nu acționează în mod necesar asupra unui substrat plasmatic, colinesteraza secretată de către hepatocite în plasmă poate fi inclusă în această grupă. Suferința sau mai bine zis insuficiența funcțională a celulelor care produc astfel de enzime se asociază cu scăderea activității plasmatice a enzimelor respective.

b) *Enzime ale secrețiilor exocrine* care pot difuza pasiv în sînge fără a avea vreun rol la acest nivel. Astfel de enzime sînt α-amilaza pancreatică și salivară, lipaza pancreatică, pepsinogenul gastric și fosfataza acidă prostatică. Așa de exemplu, s-a putut demonstra că, în condiții fiziologice, peste 98% din α-amilaza produsă în acinii glandulari ai parotidei sau ai pancreasului se varsă în canalele excretoare, iar o mică cantitate trece în limfă. Ca urmare a acestei partiții exogen-endogenă fiziologică doar cantități minime de amilază ajung în sînge, iar activitatea respectivei enzime în sucul duodenal este de 500—800 ori mai mare decît în ser. În caz de leziuni ale celulelor secretoare sau de obstrucții acute ale canaliculelor excretoare partiția amintită se alterează și un procent mult mai mare de enzime trece în limfă și de acolo în plasmă. În principiu, atrofierea organului producător de enzime ar trebui să se însoțească de o scădere a activității serice a enzimelor din această categorie. Practica arată însă că astfel de modificări sînt puțin exprimate și că insuficiența funcțională a celulelor producătoare poate fi mai bine evaluată prin dozarea enzimelor în produsul de secreție (respectiv în sucul duodenal în cazul α-amilazei pancreatice).

c) *Enzime celulare*, care acționează exclusiv intracelular și al căror substrat și cofactori nu se găsesc în plasmă. Astfel de enzime denumite și enzime plasmatice nefuncționale apar în plasmă în condiții fiziologice în concentrații de sute de ori mai mici decît în celule și cresc atunci cînd se produce o alterare a membranei celulare permițîndu-se astfel „scurgerea" lor în lichidul interstițial, limfă și plasmă. Astfel de enzime celulare (enzime plasmatice de leziune) sînt lacticodehidrogenaza (LDH), aspartataminotransferaza (AST, GOT), alaninaminotransferaza (ALT, GPT)), creatinkinaza (CK) și glutamatdehidrogenaza (GLDH.)

Natura enzimei celulare, al cărei nivel crește în ser, și gradul unei astfel de creșteri depind de:

1) Echipamentul enzimatic al organului lezat (vezi pag. 183 și fig. 3.13). Această noțiune nu trebuie însă absolutizată. Astfel, așa cum se vede din fig. 3.13, rinichiul este organul cel mai bogat în γ GT și cu toate acestea leziunile renale nu se însoțesc de creșteri ale γGT în ser, întrucît enzima scursă din epiteliul renal lezat nu trece în sînge ci în urină. În schimb ficatul, cu un conținut mult mai redus de γGT, este principala sursă a creșterilor enzimei în ser;

2) Localizarea intracelulară a enzimelor și permeabilitatea membranelor celulare și mitocondriale (vezi fig. 3.12 și fig. 3.18);

3) Gradul de vascularizație a organului lezat și viteza de circulație la nivelul zonelor lezate;

4) Prezența sau absența unei bariere inflamatorii;

5) Solubilitatea enzimei în lichidul extracelular și măsura în care celulele lezate vin în contact direct cu plasma (datorită contactului intim între hepatocite și plasmă, leziunile hepatice permit o deversare rapidă

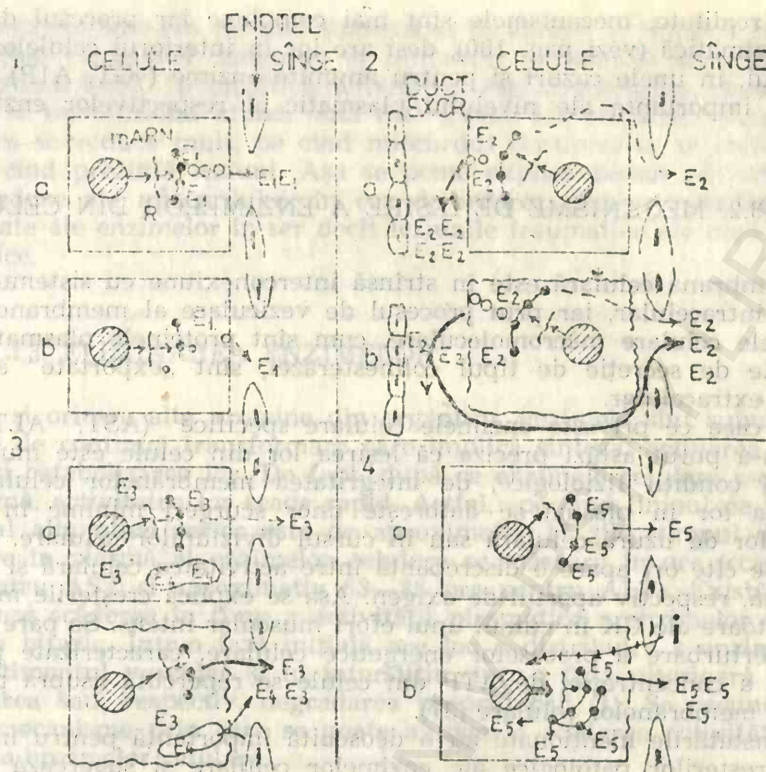


Fig. 3.18. Provenienţa enzimelor serice în condiţii fiziologice (*a*) şi patologice (*b*). 1) Enzime secretate activ în plasmă (E_1) al căror nivel scade în caz de insuficienţă a organului producător. 2) Enzime ale secreţiilor exocrine (E_2) din care un mic procent trece în plasmă printr-o partiţie exogen-endogenă. Nivelul plasmatic al unor astfel de enzime creşte în caz de obstrucţie a ductului excretor sau în urma permeabilizării excesive a membranei celulelor producătoare. 3) Enzime strict celulare citoplasmatice (E_3) sau mitocondriale (E_4) al căror nivel creşte în plasmă în urma leziunilor care duc la creşterea permeabilităţii membranelor celulare. 4) Enzime inductibile (E_5) care, sub efectul unui agent inductor (I), ajung să fie sintetizate în exces de către celule şi trec apoi în cantităţi sporite în plasmă.

a enzimelor în caz de leziuni celulare; în cazul altor organe trecerea din celule în sînge se face mai lent prin intermediul lichidului interstiţial şi al limfei);

6) Viteza de degradare sau de eliminare a enzimei celulare ajunse în plasmă;

7) Numărul de celule lezate, gradul de afectare a fiecărei celule şi viteza cu care s-au produs leziunile.

Clasificarea fiziopatologică arătată şi care distinge enzime plasmatice funcţionale, enzime de secreţie exocrină şi enzime celulare reprezintă o simplificare excesivă a problemei şi este prezentată din necesităţi de ordin didactic.

În realitate, mecanismele sînt mai complexe iar procesul de inducere enzimatică (vezi pag. 180), deși are loc în interiorul celulelor, poate contribui, în unele cazuri și pentru anumite enzime (γGT, A1P), la modificări importante ale nivelului plasmatic al respectivelor enzime.

III.3.2. MECANISME DE IEȘIRE A ENZIMELOR DIN CELULE

Membrana celulară este în strînsă interconexiune cu sistemul canalicular intracelular, iar prin procesul de veziculare al membranei, componentele celulare macromoleculare, cum sînt proteinele plasmatice sau enzimele de secreție de tipul colinesterazei, sînt „exportate" activ în mediul extracelular.

În ceea ce privește enzimele celulare specifice (AST, ALT, CK, LDH) s-a putut astăzi preciza că ieșirea lor din celule este mult limitată, în condiții fiziologice, de integritatea membranelor celulare, iar prezența lor în plasmă se datorește unor scurgeri minime în cadrul proceselor de uzură celulară sau în cursul diviziunilor celulare, precum și ori de cîte ori apare o discrepanță între activitatea celulară și irigația sanguină, respectiv aportul de oxigen. Așa se explică creșterile moderate și trecătoare ale CK în cursul unui efort muscular intens. Se pare deci că orice perturbare a proceselor energetice celulare, caracterizate printr-o scădere a concentrației de ATP din celule se repercută asupra permeabilității membranelor celulare (37).

Constatările menționate au o deosebită importanță pentru interpretarea creșterilor patologice ale enzimelor celulare și sugerează că astfel de creșteri nu implică necroza sau liza celulelor. De fapt, celulele lezate, de exemplu în cursul unei hipoxii trecătoare și din care a survenit o scurgere de enzime, continuă să respire și să consume glucoză, deși au un conținut mai scăzut de glicogen și de ATP, o alterare a funcțiilor membranei și o diminuare a sintezei de proteine. Astfel de celule care au pierdut enzime în mediul extracelular se pot reface dacă acțiunea factorilor nocivi încetează.

Pe de altă parte, alterarea ireversibilă a membranei celulare este urmată foarte rapid de necroza celulelor iar cercetările clinice sînt de acord în a stabili o oarecare legătură între severitatea unei boli și gradul de modificare a activității plasmatice a enzimelor ieșite din celule. În astfel de cazuri cu leziuni severe, se constată și o creștere a enzimelor de proveniență mitocondrială. Cu toate acestea, s-ar părea că celulele necrotice contribuie doar în mică măsură la creșterea activităților serice ale enzimelor celulare. După E. Schmidt și F. W. Schmidt cele mai importante scurgeri de enzime survin doar din celulele muribunde sau, ca de exemplu în cazul hepatitei virale acute, din celule lezate dar care supraviețuiesc (37).

Este de altfel evident că gradul de creștere în plasmă al enzimelor celulare depinde nu numai de gradul de lezare a fiecărei celule dar și de numărul celulelor afectate.

Așa cum s-a mai arătat (vezi pag. 194), intensitatea modificărilor enzimelor celulare în sîngele cinculant este influențată și de viteza cu care

aceste enzime trec din lichidul interstițial în plasmă și implicit de particularitățile circulației sanguine și limfatice, precum și de măsura în care organul lezat își modifică activitatea. Așa de exemplu, musculatura striată se imobilizează atunci cînd este lezată, iar circulația sanguină și limfatică se reduce mult, pe cînd miocardul continuă să se contracte și atunci cînd prezintă leziuni. Așa se poate explica faptul că leziuni relativ reduse ale miocardului, în caz de infarct, produc modificări mai exprimate ale enzimelor în ser decît leziunile traumatice ale musculaturii scheletice.

III.3.3. ELIMINAREA ENZIMELOR

Ca și oricare alte proteine din organism, enzimele sînt supuse unor procese de continuă transformare care implică sinteza, activarea, inactivarea și catabolizarea lor. De fapt, după ce enzimele celulare s-au scurs în plasmă, activitatea lor scade rapid. Astfel, pe cînd timpul de înjumătățire al albuminei serice este de aproximativ 17 zile, timpul de înjumătățire în plasmă al enzimelor celulare se măsoară în ore (cca 46—58 ore pentru AST și aproximativ 63—88 ore pentru ALT). Există dovezi după care scăderea în timp a activității plasmatice a enzimelor celulare decurge bifazic. Într-o fază inițială are loc o distribuire a enzimelor în compartimentul vascular și în interstițiu, într-o fază ulterioară survine eliminarea sau, respectiv, degradarea propriu-zisă (1). Se recunosc mai multe mecanisme prin care se poate ajunge la scăderea activității plasmatice a enzimelor celulare.

Un prim mecanism este reprezentat de inactivarea enzimei care suferă modificări structurale în cursul trecerii prin membrana celulară și ajunge în mediul străin al compartimentului extracelular. Așa de exemplu, creatinkinaza (CK) suferă un proces de oxidare a grupărilor SH din centrul activ al enzimei, procesul fiind însă parțial reversibil printr-o „reactivare" ce poate fi obținută prin adaosul de compuși conținînd grupări SH (1).

Un alt mecanism care intervine în cazul enzimelor cu greutate moleculară mică, ca de exemplu α-amilaza, este acela al eliminării pe cale urinară. Există, de asemenea, indicii că cel puțin o parte a fosfatazei alcaline hepatice se elimină pe cale biliară.

Cea mai mare parte a enzimelor celulare sînt însă îndepărtate din plasmă printr-un proces de captare și degradare în macrofage. Viteza cu care enzimele pătrund din celule în lichidul interstițial și de acolo în limfă și plasmă, precum și viteza cu care aceste enzime sînt îndepărtate din torentul circulator variază de la enzimă la enzimă și au o deosebită importanță diagnostică, întrucît recoltările de sînge efectuate la un interval de timp prea scurt sau respectiv prea lung de la evenimentul patologic acut, pot da rezultate negative. Așa de exemplu, în cursul infarctului miocardic AST și CK încep să crească la valori cu importanță diagonstică după 4—8 ore de la debutul fenomenelor acute și se reîntorc la valorile normale după aproximativ 3—6 zile, în timp ce LDH, care pătrunde mai lent în torentul circulator, ajunge să crească în mod semnificativ abia după 8—12 ore, dar valorile crescute se mențin timp

de 10—15 zile. Este interesant de relatat marea diferență între izoenzimele LDH în privința vitezei de eliminare din plasmă. Astfel, izoenzimele 1 și 2 (tipul miocardic) persistă în plasmă un timp suficient de lung spre a avea o valoare diagnostică, pe cînd izoenzima LDH-5 (tipul muscular și hepatic) se elimină extrem de rapid și din acest motiv prezintă creșteri cu valoare diagnostică doar în caz de leziuni supraacute și extrem de extinse ale ficatului sau ale musculaturii (1).

Enzimele hepatice de secreție (colinesterază, LCAT, factori ai coagulării) sînt și ele degradate în organism, iar timpul lor de înjumătățire variază între 10—14 zile, în cazul colinesterazei, și cîteva ore în cazul factorului VII al coagulării (12, 34).

III.3.4. ENZIMELE ÎN URINĂ

Activitățile enzimatice detectabile în urină pot proveni, în principiu, din următoarele surse: 1. filtrarea glomerulară a enzimelor din plasmă; 2. remanierea permanentă a celulelor renale, ureterale și vezicale; 3. creșterea cu caracter tranzitoriu a permeabilității celulelor tubulare (de exemplu, în cursul unei hipoxii); 4. secrețiile genitale (de exemplu, fosfataza acidă din lichidul prostatic); 5. celule sanguine (hematii, leucocite); 6. bacterii.

Cu excepția amilazei pancreatice și salivare și a pepsinogenului gastric (uropepsinogen), eliminarea prin filtrare glomerulară a enzimelor din plasmă este limitată de greutatea lor moleculară ridicată, iar micile cantități scăpate prin capsula lui Bowman sînt captate în celulele tubulare. Prin urmare, enzimele celulare scurse în plasmă (AST, ALT, CK) contribuie în măsură neînsemnată la activitățile enzimatice din urină, a căror principală sursă s-au dovedit a fi celulele renale. De fapt, activitățile LDH (izoenzimele 1 și 2) și a γGT (o enzimă care se găsește în mari cantități în celulele tubulare renale) cresc mult în urină în cursul bolilor renale acute precum și în caz de rejet al unui transplant de rinichi. Apariția în urină în astfel de condiții patologice a GLDH, cu o greutate moleculară de 1.000.000, ceea ce exclude o filtrare glomerulară, constituie un argument puternic pentru proveniența din celulele renale a activităților enzimatice urinare. Dozările de enzime urinare nu sînt însă suficient de bine standardizate. În plus, variații mari de pH urinar pot afecta funcționalitatea enzimelor, iar o serie de peptide urinare pot exercita un efect inhibitor (13).

III.4. VALOAREA DIAGNOSTICĂ A DETERMINĂRILOR DE ENZIME

Înainte de a analiza comportarea enzimelor serice în cîteva boli în care determinările de enzime își găsesc o oarecare importanță diagnostică, considerăm util a prezenta sub formă de tabel sinoptic cîteva date privind semiologia enzimelor (vezi tabelul 3.5). Detalii referitoare la astfel de determinări în lumina datelor clinice sînt prezentate în text.

Tabelul 3.5

Semiologia principalelor enzime utilizate în diagnosticul de laborator

Enzima	Proveniență	Modificări patologice	Observații
Aspartataminotransferaza (AST, GOT)	ficat, miocard, mușchi; mici cantități în rinichi, pancreas, plămîni, eritrocite	*Creșteri marcate:* infarct miocardic, hepatită acută, leziuni toxice acute ale ficatului *Creșteri moderate:* hepatite cronice, mononucleoză infecțioasă, colici biliare, afecțiuni musculare	În ficat: 60% în citosol și 40% în mitocondrii
Alaninaminotransferaza (ALT, GPT)	citosolul hepatocitelor; cantități reduse în miocard, mușchi, rinichi, pancreas	*Creșteri marcate:* hepatită acută și leziuni toxice ale ficatului *Creșteri moderate:* hepatite, cronice, mononucleoză, colici biliare	Exclusiv în citosolul hepatocitelor și mai ales în celulele de la periferia lobulilor hepatici
Lactatdehidrogenaza (LDH)	musculatură, ficat, miocard, rinichi; cantități reduse în pancreas, eritrocite, plămîni	*Creșteri marcate:* infarct miocardic, leziuni toxice acute ale ficatului, anemie megaloblastică *Creșteri moderate:* hepatita acută, hemoliza acută, boli musculare, sindrom mieloproliferativ, limfoame maligne, infarct pulmonar	Izoenzimele LDH_1 și LDH_2 în boli miocardice și anemia Biermer. LDH_4 și LDH_5 în leziuni acute ale ficatului și musculaturii
Creatinkinaza (CK)	musculatură, miocard, creier	*Creșteri importante:* infarct miocardic, dermatomiozite, distrofie musculară progresivă, rabdomioliză și mioglobinurie *Creșteri moderate:* după injecții intramusculare cu diazepam, tetraciclină, pentazocină și în hipotiroidism	S-au evidențiat 3 izoenzime dimerice: CK/MM de origine musculară și miocardică, CK/BB din creier și CK/MB exclusiv miocardică
Glutamatdehidrogenaza (GLDH)	*ficat:* în cantitate redusă în rinichi, creier, plămîni, miocard	Creșteri în leziuni severe ale hepatocitelor	Enzimă mitocondrială
α-Amilaza	glande salivare, pancreas	*Creșteri importante:* pancreatita acută *Creșteri moderate:* parotidite, obstrucții ale căilor excretorii ale glandelor salivare sau pancreatice; ulcer perforat, insuficiență renală, sarcină extrauterină, opiacee, macroamilazemie	Există izoamilaze pancreatice și salivare Creșterea în ser e de scurtă durată, α-amilaza apărînd apoi în urină

Tabelul 3.5 (continuare)

Enzima	Proveniență	Modificări patologice	Observații
Fosfataza alcalină (Al.P)	ficat, oase, duoden, rinichi	*Creșteri importante :* în colestaza intra- și extrahepatică, în boli osoase asociate cu reacție osteoblastică (rahitism, osteomalacie, boala Paget, metastaze osoase) *Scăderi :* în hipofosfatazie genetică, acondroplazie, mixedem	La copii valori normale aproximativ duble față de adulți Enzimă inductibilă Există izoenzime hepatice, osoase și intestinale
Fosfataza acidă (Ac.P)	prostată mici cantități în eritrocite, plăcuțe, rinichi, ficat	*Creșteri moderate :* carcinom prostatic cu depășirea capsulei; uneori în carcinoame mamare cu metastaze osoase	Enzimă foarte labilă Izoenzima prostatică este tartrat inhibabilă
γ-glutamil-transferaza (γGT)	rinichi, pancreas, ficat	*Creșteri importante :* colestaza intra- și extrahepatică, tumori hepatice, alcoolism *Creșteri moderate :* hepatite cronice, pancreatite, ficat de stază, barbiturice	Enzimă inductibilă
Colinesteraza (CHE)	Secretată activ de către hepatocite	*Scăderi importante :* insuficiența hepatică (mai ales ciroze), intoxicație cu organofosforice *Scăderi moderate :* denutriție, reacție de fază acută (postoperator), anemii severe, hipotiroidism *Creșteri moderate :* sindrom nefrotic, diabet cu obezitate, hiperlipemii tip II b și IV, hipertiroidism (fără cașexie)	S-au descris variante genetice cu modificări ale activității și mai ales cu deficit de hidroliză a succinilcolinei

III.4.1. INFARCTUL MIOCARDIC

Infarctul miocardic este cauzat de obstrucția unei ramuri a arterelor coronare avînd drept urmare o ischemie acută a unei zone din miocard care poate ajunge pînă la leziuni necrotice. Ținînd seama de acest mecanism patogenetic, dezvoltarea leziunilor miocardice decurge cu anumite particularități: debutul leziunii survine acut; intervalul de timp în care se instalează leziunile este relativ scurt; zona afectată este relativ limitată și localizată; severitatea leziunilor suferite de fiecare celulă afectată este de regulă foarte accentuată. Ca urmare a particularităților amintite, interpretarea modificărilor suferite de enzimele provenite din miocardul lezat trebuie să țină seama de intervalul de timp scurs de la debutul fenomenelor acute. Așa cum reiese din fig. 3.19 și tabelul 3.6, creșterea CK, GOT și LDH prezintă o anumită dinamică. Intervalul de timp de la debutul manifestărilor clinice și pînă la creșterea activității enzimelor în ser depinde de decalajul între producerea obstrucției coro-

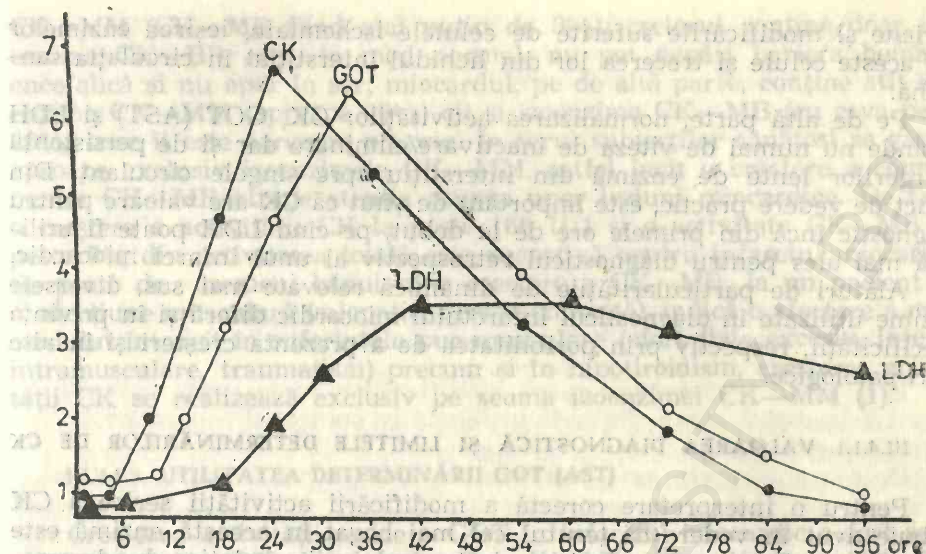


Fig. 3.19. Dinamica creşterii CK, GOT, şi LDH în cursul infarctului miocardic. Pe abscisă: timpul în ore; pe ordonată activitatea enzimei în ser, exprimată în multipli ai limitei superioare a valorilor normale.

Tabelul 3.6

Comportarea activităţilor CK, GOT(AST) şi LDH în infarctul miocardic în funcţie de intervalul de timp. După Schmidt şi Schmidt(37) cu unele completări

Enzima serică	Intervalul de timp de la debut			Creşterea maximă (multiplii ai limitei superioare a normalului)	Observaţii
	Pînă la detectarea unor creşteri cu valoarea diagn.	Pînă la atingerea valorilor maxime	Pînă la normalizarea valorilor		
CK	4–8 ore	16–36 ore	3–6 zile	7 (2–25)	Leziuni musculare pot da creşteri ale CK; Izoenzima CK/MB este mai specifică pentru miocard
GOT (AST)	4–8 ore	16–48 ore	3–6 zile	6 (2–24)	GOT (dar nu şi CK) poate creşte şi în infarctul pulmonar
LDH	6–12	24–60	7–15	3·3(2–8)	Izoenzimele LDH_1 şi LDH_2 sînt mai specifice pentru infarctul miocardic

nariene și modificările suferite de celulele ischemiate, ieșirea enzimelor din aceste celule și trecerea lor din lichidul interstițial în circulația sanguină.

Pe de altă parte, normalizarea activităților CK, GOT (AST) și LDH depinde nu numai de viteza de inactivare/eliminare dar și de persistența scurgerilor lente de enzimă din interstițiu spre sîngele circulant. Din punct de vedere practic, este important de știut că CK are valoare pentru diagnostic încă din primele ore de la debut, pe cînd LDH poate fi utilizată mai ales pentru diagnosticul retrospectiv al unui infarct miocardic.

Alături de particularitățile de dinamică relevate mai sus, diversele enzime utilizate în diagnosticul infarctului miocardic diferă și în privința specificității, respectiv prin posibilitatea de a prezenta creșteri și în alte stări patologice.

III.4.1.1. VALOAREA DIAGNOSTICĂ ȘI LIMITELE DETERMINĂRILOR DE CK

Pentru o interpretare corectă a modificării activității serice a CK trebuie avut în vedere că țesutul cel mai bogat în această enzimă este musculatura. Prin urmare, leziuni ale musculaturii scheletice duc la creșteri ale CK care, în anumite situații, pot preta la confuzii cu modificările cauzate de un infarct miocardic. Astfel de confuzii pot fi evitate prin determinarea izoenzimei specifice miocardului (CKMB). Întrucît o astfel de determinare nu este întotdeauna posibilă, relatăm cîteva situații care pot duce la creșteri ale CK de origine musculară:

— Efortul fizic excesiv mai ales efectuat de persoane neantrenate;

— Traumatisme ale musculaturii care pot fi date chiar și de injecții i.m. cu anumite preparate dintre care amintim tetraciclinele, penicilinele, diazepamul și unele antiaritmice. Este evident că astfel de modificări ale activității CK au o deosebită importanță pentru diagnosticul diferențial al unui infarct miocardic.

— Creșteri ale activității CK pot surveni în leziuni toxice ale musculaturii (miopatie alcoolică), miopatii degenerative, hipertermie malignă sau dermatomiozite (vezi pag. 205);

— Hipotiroidismul sever se însoțește adeseori de valori crescute ale CK, care revin la normal în cursul tratamentului hormonal substitutiv;

— Hipoxia severă a musculaturii survenită în stări de șoc (șoc cardiogen în cursul unui infarct miocardic sau șoc hemoragic) poate duce la creșteri extrem de accentuate ale CK;

— Aplicarea șocurilor electrice în cursul tratamentelor de conversie a unei aritmii, survenite uneori ca o complicație a infarctului miocardic, poate duce, prin contracturi ale musculaturii scheletice, la creșteri mult mai mari ale CK decît cele explicabile prin leziunea miocardică.

III.4.1.2. APORTUL DIAGNOSTIC AL DETERMINĂRILOR DE IZOENZIME ALE CK

Așa cum s-a arătat (vezi tabelul 3.5), se pot distinge trei izoenzime ale CK: CK—MM (tipul muscular), CK—BB aflată în creier și CK—MB de proveniență miocardică. Mușchii conțin aproape în exclusivitate doar

CK—MM (CK—MB fiind mai puțin de 3%); creierul conține doar izoenzime CK—BB care, în mod normal, nu pot depăși bariera hematoencefalică și nu apar în ser; miocardul, pe de altă parte, conține atît izoenzima CK—MM (aproape 80%) cît și izoenzima CK—MB (cu ceva peste 20%) care îi este oarecum proprie. În serul subiecților sănătoși se găsesc aproape exclusiv izoenzimele CK—MM, astfel încît o creștere a componentei CK—MB atrage atenția asupra unor leziuni miocardice. De fapt, o creștere a activității CK la peste 160 U/1 și o activitate CK—MB de peste 5% din activitatea totală este sugestivă pentru infarctul miocardic. Se poate de asemeni bănui că o creștere a CK—MB, la un pacient cu o afecțiune musculară (miopatie, dermatomiozită), indică o afectare a miocardului întrucît în suferințele pur musculare (efort fizic excesiv, injecții intramusculare, traumatism) precum și în hipotiroidism, creșterea activității CK se realizează exclusiv pe seama izoenzimei CK—MM (1).

III.4.1.3. UTILITATEA DETERMINĂRII GOT (AST)

Creșterea activității serice a GOT în infarctul miocardic a fost semnalată încă din 1954 de către La Due, Wroblewski și Karmen (22). Deși între timp s-au introdus determinările de CK—MB și de LDH_1 (α HBDH), explorarea activității GOT nu și-a pierdut utilitatea. De fapt, spre deosebire de CK, GOT crește doar în mică măsură în afecțiunile musculaturii. Se consideră de altfel utilă stabilirea raportului CK/GOT care, în cazul unui infarct miocardic, este în medie de 5 (de exemplu, CK = 300 U/1; GOT = 60 U/L), pe cînd într-o leziune a musculaturii scheletice acest raport depășește valoarea de 10, fiind în medie de 27. Trebuie avut însă în vedere că GOT poate crește în infarctul pulmonar precum și în boli hepatice (vezi pag. 215). În astfel de situații, nu se ajunge la creșteri ale CK.

III.4.1.4. ROLUL DETERMINĂRILOR DE LDH

Deși modificările afectînd LDH în infarctul miocardic sînt relativ mai puțin exprimate și survin mai tardiv decît în cazul CK și AST, creșterea activității LDH (și în special a izoenzimelor LDH_1 și LDH_2) contribuie la stabilirea diagnosticului în cazurile care, din diverse motive, ajung să fie investigate doar după cîteva zile de la instalarea leziunilor miocardice. Amintim de pe acum, importantele creșteri ale LDH_1 și LDH_2 survenind în cursul anemiilor megaloblastice (1, 36, 37).

III.4.1.5. DIAGNOSTICUL ENZIMATIC AL COMPLICAȚIILOR INFARCTULUI MIOCARDIC

Subliniem de la bun început că monitorizarea comportării enzimelor serice poate surprinde un proces de reinfarctizare, pe cînd modificările electrocardiografice sînt adeseori înșelătoare în astfel de cazuri. Determinările de enzime pot furniza și relații cu privire la o eventuală insuficiență acută a inimii drepte. Congestia hepatică instalată cu o deose-

bită rapiditate duce la creşterea în ser a unor enzime de provenienţă hepatică (GOT, GPT, LDH_{4-5}) care pot fi greşit interpretate ca fiind cauzate de o hepatită acută virală. Staza hepatică ca şi modificările proteosintezei hepatice consecutive reacţiei de fază acută explică şi scăderea nivelului colinesterazei serice constatată adeseori în zilele şi săptămînile care urmează unui infarct miocardic sever (1, 16, 21).

În cazul instalării şocului cardiogen şi implicit a unei hipoxii generalizate care interesează musculatura striată, se ajunge la o creştere excesivă a CK, LDH_{4-5} (1, 37).

III.4.1.6. EVALUAREA CRITICĂ A TESTELOR ENZIMATICE

Este evident că interpretarea modificărilor enzimatice survenite în cursul infarctului miocardic trebuie făcută în contextul aspectelor clinice şi electrocardiografice.

De cele mai multe ori, modificările ECG preced creşterea enzimelor de leziune astfel încît determinările de CK, GOT (AST) şi LDH vin doar să confirme diagnosticul şi eventual să evalueze gradul de afectare a miocardului. Există însă şi situaţii în care semnele clinice şi electrocardiografia sînt necaracteristice. Aşa de exemplu, în aproximativ 10% din cazurile de infarct, semnele ECG sînt neconcludente. Astfel de situaţii pot surveni mai ales în cazul microinfarctelor diseminate, în caz de preexistenţă a unei hipertrofii miocardice, în caz de persistenţă a unor sechele ale unui infarct anterior, bloc de ramură, tulburări de ritm sau sindrom Wolf-Parkinson-White. Subliniem că o reinfarctare poate fi uşor decelată prin determinări ale CK, GOT sau LDH, pe cînd recunoaşterea unui astfel de proces prin examinări ECG întîmpină dificultăţi. O situaţie particulară este reprezentată de aşa-zisul infarct silenţios, adică survenit în absenţa fenomenelor dureroase. În vederea depistării unor astfel de cazuri se recomandă investigaţiile ECG şi dozările de enzime ori de cîte ori se constată instalarea bruscă a unei insuficienţe cardiace, episoade de dispnee acută, aritmii sau edem pulmonar (47).

O problemă mult dezbătută este aceea a posibilităţii de a evalua extinderea leziunii miocardice şi implicit prognosticul unui infarct miocardic prin determinări de enzime. O astfel de evaluare întîmpină dificultăţi datorită, în primul rînd, creşterilor de CK—MM în condiţiile amintite (injecţii intramusculare, şoc cu hipoxie musculară).

Prin determinarea suprafeţei curbei realizate prin dozări seriate de CK—MB se pot trage totuşi anumite concluzii asupra extinderii leziunii şi implicit asupra riscului instalării unei insuficienţe de pompă (47). Nu trebuie uitat însă că gravitatea şi prognosticul unui infarct miocardic depinde nu numai de extinderea leziunii dar şi de localizarea ei. De fapt infarcte cu extindere relativ mică dar survenite în sistemul excitoconductor comportă un prognostic mai rezervat decît infarctele cu o altă localizare. Nu trebuie uitată nici posibilitatea ca decesul să survină în primele ore de la debutul infarctului miocardic, cînd nivelul enzimelor nu a ajuns încă la valori semnificativ crescute.

Pe de altă parte, terapia fibrinolitică (streptokinaza, urokinaza, t-PA), cu efecte în mod cert favorabile asupra evoluţiei infarctului, se

însoțește de creșteri marcate și precoce ale enzimelor celulare. Fenomenul își găsește o explicație în reperfuzia miocardului și „spălarea" enzimelor din zona de leziune, care trec astfel în cantitate sporită și în ritm accelerat în torentul circulator (1, 33).

III.4.1.7. MODIFICĂRI ALE ENZIMELOR SERICE ÎN ALTE BOLI CARDIACE

De cele mai multe ori, angina pectorală nu se însoțește de creșteri semnificative ale CK, GOT (AST) sau LDH. Nu trebuie uitată însă posibilitatea trecerii progresive de la angina pectorală la microinfarcte, iar într-o astfel de situație explorarea seriată a CK poate fi de o reală utilitate pentru depistarea stării de preinfarct și instituirea precoce a unei terapii adecvate.

Miocarditele produc creșteri ale CK, GOT și LDH doar atunci cînd au o evoluție deosebit de acută și duc la procese necrotice diseminate. Apariția bruscă a unei insuficiențe cardiace în contextul unei miocardite complică specificul enzimelor serice prin eliberarea de GOT, GPT și LDH_{4-5} din ficatul congestionat. Același fenomen poate surveni și în cursul unui infarct pulmonar care duce la o insuficiență acută a inimii drepte și la staza hepatică. De notat că hepatocitele din centrul lobulului hepatic, adică cele aflate în jurul venei centrolobulare, sînt deosebit de bogate în LDH și totodată sînt cele mai afectate de o congestie hepatică rapid instalată (21).

Dacă însă insuficiența cardiacă se dezvoltă lent și progresiv, staza hepatică consecutivă nu duce la modificări apreciabile ale GPT, GOT și LDH. S-a constatat însă (45) o scădere progresivă a colinesterazei serice denotînd o reducere a capacității proteosintetice a ficatului, precum și o tendință la creștere a enzimelor indicatoare ale colestazei, așa cum sînt fosfataza alcalină și γ-glutamiltransferaza (vezi pag. 243). Conform așteptărilor, intervențiile chirurgicale pe cord se însoțesc de o creștere a enzimelor de proveniență miocardică (1).

III.4.2. BOLILE MUSCULATURII

O treime din masa corporală este reprezentată de musculatură, care conține cantități importante de CK-MM, LDH_{4-5}, aldolază (ALD) și GOT (AST). Ar trebui prin urmare ca orice leziune musculară să se însoțească de creșteri marcate ale acestor enzime în ser.

Gradul de modificare a activității serice a enzimelor menționate depinde însă în mare măsură de starea de activitate a musculaturii și implicit de fluxul sanguin capabil să antreneze în torentul circulator enzimele scurse din musculatura lezată. Așa se explică faptul că după contuzii sau chiar după intervenții chirurgicale, care produc leziuni limitate ale musculaturii, creșterile activităților serice ale CK, LDH și GOT nu sînt deosebit de accentuate, musculatura lezată fiind pusă în repaus și avînd o circulație sanguină restrînsă.

Pe de altă parte, efortul fizic intens care antrenează o creștere importantă a fluxului sanguin în musculatură duce la creșteri semnifica-

tive ale CK și, în mai mică măsură, ale GOT și LDH deși, în astfel de cazuri, leziunile musculare sînt minime, fiind probabil consecința unei hipoxii relative și trecătoare. Reamintim că hipoxia severă și generalizată a musculaturii, survenită în cursul stărilor de șoc, se însoțește de creșteri deosebit de marcate ale enzimelor de proveniență musculară.

Așa cum s-a mai arătat (vezi pag. 202), injecțiile intramusculare cu tetracicline, peniciline, diazepam și antiaritmice duc la creșteri ale enzimelor de proveniență musculară (în special CK—MM), fapt care atrage atenția asupra importanței naturii chimice a substanței injectate în producerea eliberării unor astfel de enzime.

Distrofiile musculare reprezintă principalul domeniu al afecțiunilor musculaturii în care determinările de enzime își găsesc o valoare diagnostică. Creșteri deosebit de exprimate ale CK și aldolazei și într-o mai mică măsură a GOT și LDH_{4-5} se întîlnesc în distrofia musculară progresivă și mai ales în tipul Duchenne. Modificările survenite în tipul rizomelic, tipul facioscapulo umeral, distrofia miotonică precum și în bolile neuromusculare (atrofii musculare consecutive unor leziuni nervoase) sînt mai puțin exprimate. Important este faptul că în fazele de debut ale distrofiei musculare progresive, cînd manifestările clinice locomotorii sînt relativ mai atenuate, iar pierderile de substanță musculară sînt încă mici, se constată cele mai importante modificări ale enzimelor serice. Pe măsură însă ce boala progresează și musculatura este înlocuită de țesut conjunctiv și grăsime, nivelul enzimelor serice scade, astfel încît la bolnavii imobilizați activitatea enzimelor serice ajunge adeseori în limite normale.

Determinările de enzime pot fi utilizate și pentru stabilirea mecanismului de transmitere ereditară a acestor afecțiuni cu caracter familial și permit depistarea precoce a membrilor de familie care sînt predispuși să facă boala (subiecți de sex bărbătesc). Se pot, de asemenea, depista și femeile transmițătoare, care, deși nu fac boala clinic manifestă, pot transmite gena patologică (legată de cromozomul X) descendenților de sex masculin. Astfel de transmițătoare au, de regulă, un nivel seric de CK și de aldolază situat deasupra limitei superioare a normalului.

Dermatomiozitele se însoțesc și ele, mai ales în cursul puseelor acute, de creșteri importante ale CK, LDH și GOT. Tratamentul cu cortizon normalizează nivelul acestor enzime în caz de dermatomiozită dar rămîne fără efect în distrofiile musculare progresive (1, 36, 37).

Hipertermia malignă, o formă particulară de miopatie care survine în cursul anesteziilor, beneficiază din plin de examinarea comportării în ser a enzimelor de proveniență musculară. Această „explozie metabolică" survine rar (1 caz la 20.000—50.000 anestezii), dar este de o deosebită gravitate (deces în aproximativ 60% din cazuri), iar pe de altă parte ridică probleme interesante de patogeneză. Fenomenele se declanșează de către unii agenți anestezici și relaxanți musculari depolarizanți administrați unor subiecți cu o susceptibilitate particulară (transmisă genetic printr-un mecanism încă neelucidat). Cei mai cunoscuți agenți declanșatori sînt halotanul și succinilcolina, dar pot veni în discuție și eterul, tricloretilena, ciclopropanul, xilina, diazepamul și chiar barbituricele.

La scurt timp după administrarea unuia din agenții de mai sus, subiectul susceptibil dezvoltă în mod rapid tahicardie, tahipnee, rigiditate musculară (debutată de regulă cu trismus) și o creștere extrem de accentuată a temperaturii (uneori 41°C—42°C).

Patogeneza fenomenelor de mai sus pare a fi legată de o anomalie a fluxului intracelular de calciu. Se incriminează o deficiență a membranelor care învelesc depozitele de calciu din musculatura striată sau un eventual defect genetic al pompei de calciu, cu rol de a împinge calciul înapoi în depozite. În orice caz sub efectul unui agent declanșator se ajunge la o creștere bruscă de calciu în mioplasmă care determină o extraordinară exacerbare a oxidărilor, evoluînd cu decuplarea fosforilărilor oxidative și acidoză. Aceste fenomene sînt în măsură să explice atît febra cît și eliberarea de enzime musculare (CK, LDH, GOT aldolază) și de mioglobină din fibrele musculare afectate. Este important de știut că în astfel de situații, viteza de creștere a nivelului seric al enzimelor este deosebit de rapidă și contribuie astfel în mod decisiv la precizarea diagnosticului (31).

De notat că atît hipertermia malignă cît și alte stări patologice, evoluînd cu liza musculaturii (rhabdomioliză) și mioglobinurie (de exemplu miopatia alcoolică), pot duce la fenomene de coagulare intravasculară diseminată și insuficiență renală acută.

III.4.3. BOLI SANGUINE

Determinarea activităților unor enzime serice oferă hematologiei noi posibilități de diagnostic și de evaluare a eficacității terapiei.

Anemiile megaloblastice constituie un astfel de exemplu, creșterile LDH (izoenzimele LDH_1 și LDH_2) fiind deosebit de exprimate (36, 49). Conform experienței laboratorului nostru, valorile activității LDH s-au situat între 600 și 8500 U/L (3—40 ori limita superioară a normalului), în toate cazurile de anemie Biermer confirmate prin puncție sternală, iar tratamentul cu vitamina B_{12} a dus la o normalizare a acestei activități în decurs de 2—3 săptămîni (11).

De notat că tendința de revenire spre normal a activității LDH începe încă înainte de apariția crizei reticulocitare. Cercetări din ultimii ani (38) au arătat că activitatea serică a LDH este întotdeauna crescută în anemiile megaloblastice cu nivel sanguin scăzut de vitamina B_{12} și/sau acid folic, și cu răspuns prompt la terapia substitutivă în timp ce în anemiile megaloblastice refractare la tratamentul cu agenții menționați, activitatea LDH nu este modificată. Se poate deci afirma că dozarea LDH constituie un mijloc important de diagnostic și de evaluare a eficacității terapiei în sindroamele anemice (vezi fig. 3.20).

Mecanismele care duc la creșterea impresionantă a activității LDH în serul bolnavilor cu anemie Biermer nu sînt încă pe deplin elucidate. Se pare însă că acest fenomen se datorește, cel puțin în parte, degradării intramedulare a formelor imature ale eritronului. Pentru acest punct de vedere pledează și observațiile noastre privind valorile mult mai ridicate ale activității LDH în serul nehemolizat al sîngelui medular (2600 U/I), în comparație cu activitatea LDH în serul sîngelui recoltat din vena cubitală (950 U/U) a unui bolnav cu anemie de tip Biermer (11).

S-au descris și alte modificări ale unor enzime serice în anemiile megaloblastice, care deși nu au o valoare diagnostică, ridică totuși probleme interesante de patogeneză. Așa de exemplu, nivelul colinesterazei serice (CHE), un indicator al sintezei hepatice de proteine, este semnificativ mai scăzută la bolnavii cu anemie de tip Biermer, refăcîndu-se încet după

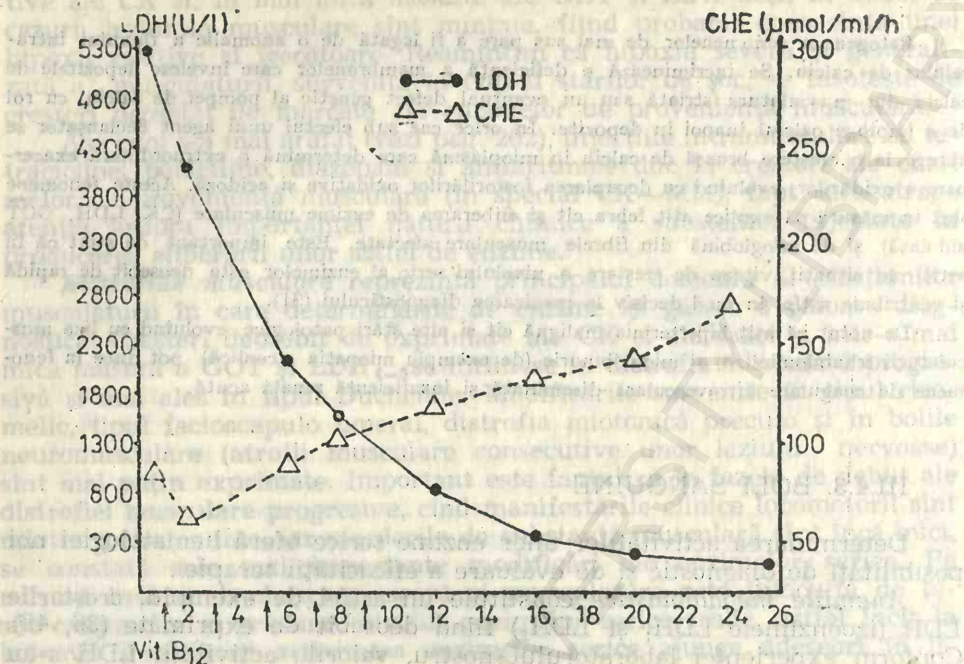


Fig. 3.20. Exemplu ilustrativ privind comportarea LDH şi CHE în serul unui bolnav cu anemie megaloblastică tratat cu vitamina B_{12}.

20—30 zile de la debutul terapiei, atunci cînd şi numărul hematiilor circulante se apropie de valorile normale (11). Scăderea CHE, într-un caz de anemie megaloblastică severă netratată, ar putea fi consecinţa unei suferinţe pur funcţionale a hepatocitelor în cadrul hipoxiei generalizate sau ca urmare a unei perturbări cu caracter generalizat a sintezei de acizi nucleici datorită carenţei de vitamina B_{12}. O astfel de suferinţă funcţională se repercută asupra capacităţii proteosintetice a ficatului fără a se însoţi de semne care să indice un proces lezional al hepatocitelor. Nu poate fi exclusă ipoteza după care nivelul seric scăzut al unor enzime hepatice inductibile aşa cum sînt fosfataza alcalină şi γ-glutamiltransferaza, constatate în majoritatea cazurilor de anemie Biermer, ar fi tot o consecinţă a deficitului de acizi nucleici avînd ca urmare o reducere a capacităţii hepatocitelor de a reacţiona la agenţii inductori (11, 49).

Anemiile hemolitice se însoţesc de creşteri ale izoenzimelor LDH_1 şi LDH_2 doar în cursul crizelor de deglobulizare acută, gradul de creştere depinzînd de gravitatea bolii. De regulă, chiar şi în astfel de crize de hemoliză, nivelul LDH se situează sub media valorilor întîlnite în anemiile megaloblastice (vezi fig. 3.21). În majoritatea cazurilor de anemie hemolitică cu evoluţie cronică, nivelul activităţii serice a LDH este normal sau doar uşor crescut. Dacă însă la un astfel de bolnav, cu anemie exprimată de natură hemolitică dar aflat în afara unei crize acute de deglobulizare, se constată o creştere importantă a LDH, se poate bănui o carenţă secundară de acid folic. O astfel de carenţă poate surveni ca

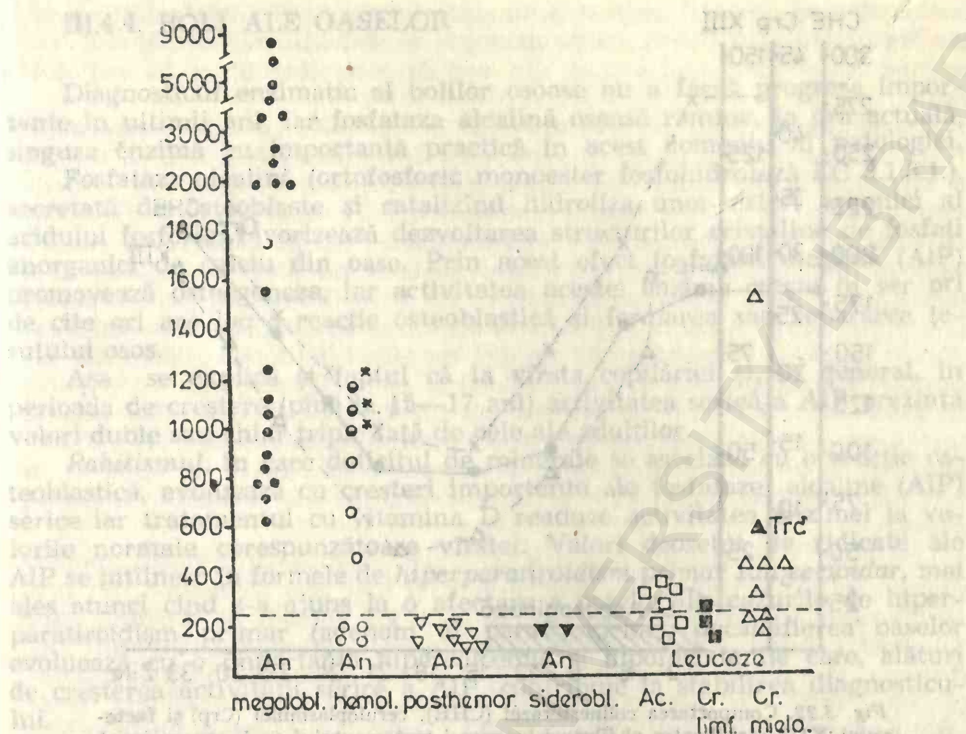


Fig. 3.21. Comportarea activității serice a LDH la bolnavii cu anemie megaloblastică, în comparație cu valorile întîlnite în alte forme de anemie sau în hemopatii maligne. Cercurile pline pe jumătate și marcate cu asterisc indică bolnavii cu anemie hemolitică severă prezentînd o carență secundară de acid folic. Trc - trombocitemie.

urmare a exacerbării cu caracter compensator a eritropoezei și consumării consecutive în ritm accelerat a rezervelor de acid folic de către eritronul hiperplaziat. Întrucît, într-o astfel de situație, elementele seriei roșii capătă un caracter macroblastic sau chiar megaloblastic, mecanismul creșterii activității serice a LDH devine similar cu cel din anemiile de tip Biermer amintit anterior (vezi fig. 3.21).

Alte anemii cum sînt cele sideroblastice (sideroacrestice), feriprive, aplastice sau posthemoragice nu se însoțesc de creșteri ale LDH sau ale altor enzime serice (11, 36, 49).

Hemopatiile maligne nu prezintă modificări caracteristice ale enzimelor serice care cresc uneori nu atît în legătură cu boala de bază cît mai ales cu eventualele complicații ale leucemiilor. Creșterea aminotransferazelor (GOT, GPT) și a LDH într-o leucoză poate astfel sugera o infiltrare leucemică a ficatului, un accident hemoragic sau trombotic sau un eventual proces de coagulare intravasculară diseminată afectînd microcirculația organelor parenchimatoase. Eliberarea de LDH din elementele figurate proliferate și care se distrug în ritm accelerat poate totuși contribui la creșterea activității sale în ser, fenomen constatat în

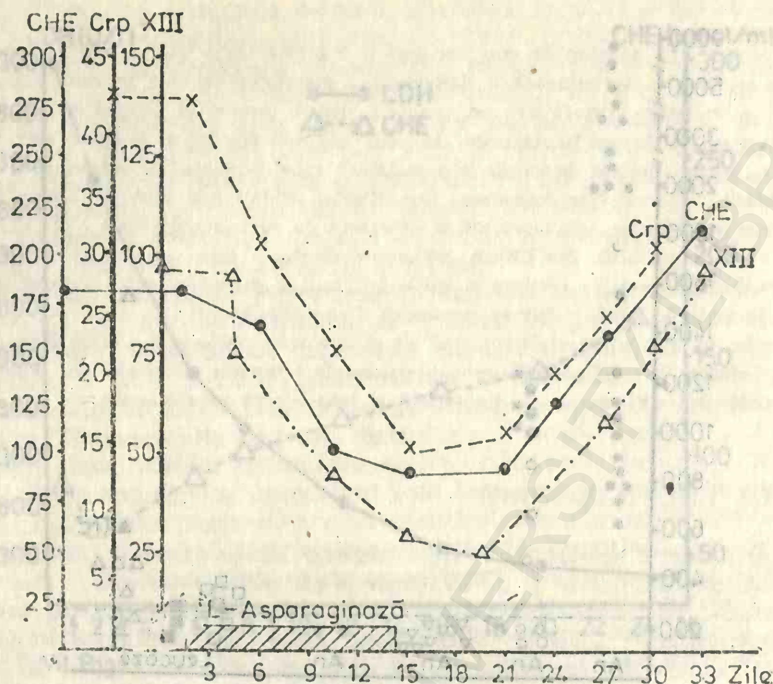


Fig. 3.22. Comportarea colinesterazei (CHE), ceruloplasminei (Crp) şi factorului XIII stabilizator al fibrinei în cursul tratamentului cu L-asparaginază la un bolnav cu leucemie limfoblastică. Pe abscisă: timpul în zile. Pe ordonată: activitatea CHE în μmd/ml/h, concentraţia ceruloplasminei în mg/dl şi activitatea factorului XIII în % din media valorilor normale.

numeroase cazuri de sindrom mieloproliferativ, mai ales în urma terapiei cu citostatice. Creşterea LDH la un bolnav cu limfom malign atrage atenţia asupra unei progresiuni rapide şi implică un prognostic rezervat. Nu trebuie apoi uitat că în unele leucemii acute proliferarea excesivă a limfoblaştilor poate duce la o carenţă secundară de vitamină B_{12} şi/sau acid folic şi modificarea în sens megaloblastic a eritropoezei. În astfel de cazuri, creşterea LDH atinge valori similare cu cele din anemia Biermer.

Un fenomen particular este reprezentat de „falsa creştere" a LDH şi a fosfatazei acide în serul bolnavilor cu trombocitemie. Se consideră că, în astfel de cazuri, enzimele menţionate se eliberează din plăcuţele sanguine excesiv de numeroase şi care se distrug în cursul coagulării sîngelui recoltat pentru laborator. Acelaşi mecanism explică şi creşterea potasiului în serul dar nu şi în plasma bolnavilor (1).

Tratamentul cu L-asparaginază al leucemiilor acute ridică o problemă interesantă cel puţin din punct de vedere teoretic De fapt, depleţia în asparagină cauzată de acest gen de terapie afectează nu numai celulele leucemice dar şi hepatocitele a căror capacitate de a sintetiza proteine este astfel sever limitată. De fapt, aşa cum reiese din fig. 3.22 terapia cu L-asparaginază produce o accentuată scădere a unor enzime secretate în plasmă de către ficat. Se pare că susceptibilitatea particulară a hepatocitelor la depleţia în asparagină se datoreşte faptului că aceste celule nu sînt dotate cu asparaginosintetază şi nu pot compensa lipsa aportului amidei menţionate. Întrucît asparagina intră în structura lanţurilor peptidice a multor proteine, sinteza acestora este compromisă (6, 7)

III.4.4. BOLI ALE OASELOR

Diagnosticul enzimatic al bolilor osoase nu a făcut progrese importante în ultimii ani, iar fosfataza alcalină osoasă rămîne, la ora actuală, singura enzimă cu importanță practică în acest domeniu al patologiei.

Fosfataza alcalină (ortofosforic monoester fosfohidrolază EC 3.1.3.1.), secretată de osteoblaste și catalizînd hidroliza unor esteri organici ai acidului fosforic, favorizează dezvoltarea structurilor cristaline de fosfați anorganici de calciu din oase. Prin acest efect fosfataza alcalină (AlP) promovează osteogeneza, iar activitatea acestei enzime crește în ser ori de cîte ori are loc o reacție osteoblastică și formarea sau repararea țesutului osos.

Așa se explică și faptul că la vîrsta copilăriei și, în general, în perioada de creștere (pînă la 15—17 ani) activitatea serică a AlP prezintă valori duble sau chiar triple față de cele ale adulților.

Rahitismul, în care deficitul de minerale se asociază cu o reacție osteoblastică, evoluează cu creșteri importante ale fosfatazei alcaline (AlP) serice iar tratamentul cu vitamina D readuce activitatea enzimei la valorile normale corespunzătoare vîrstei. Valori deosebit de ridicate ale AlP se întîlnesc în formele de *hiperparatiroidism primar sau secundar*, mai ales atunci cînd s-a ajuns la o afectare a oaselor. În cazurile de hiperparatiroidism primar (adenom al paratiroidelor), decalcifierea oaselor evoluează cu o importantă hipercalcemie și hipofosfatemie care, alături de creșterea activității serice a AlP, contribuie la stabilirea diagnosticului.

Spre deosebire de situația descrisă, în boala *Paget (osteodistrofia diformantă)*, nivelul calcemiei este normal deoarece, ca urmare a unui anumit grad de paralelism între procesele de osteoliză și osteogeneză, calciul resorbit dintr-o zonă de liză a osului este utilizat într-o altă zonă în care predomină reacția osteoblastică și refacerea osului. Din acest motiv, creșterea excesivă a AlP reprezintă un important ajutor în diagnosticul bolii Paget. Valori crescute ale AlP se mai întîlnesc și în stadiile avansate ale osteosclerozei.

Procesele tumorale primare sau secundare ale scheletului se însoțesc de creșteri ale AlP și în măsura în care pot da naștere la o reacție osteoblastică. Așa de exemplu, *tumorile primare osteogene* evoluează cu creșteri ale AlP în timp ce în sarcoamele osteolitice, (sarcom Ewing, reticulosarcoame ale oaselor), activitatea enzimei se situează în limite normale.

Procesele tumorale metastatice cu caracter osteoblastic și însoțite de creșteri marcate ale AlP sînt mai ales cele pornite de la un carcinom al prostatei. În metastazele osoase pornite din carcinoamele mamare sau din alte procese tumorale, creșterile AlP sînt mai puțin exprimate. De notat însă că valori normale de AlP la un bolnav cu o afecțiune neoplazică nu pot exclude prezența metastazelor osoase care pot evolua, uneori, cu un caracter osteolitic pur neînsoțit de reacția osteoblastică. Mai amintim că leziunile osoase din mielomul multiplu nu se asociază cu creșteri ale acestei enzime.

Valori normale ale AlP se întîlnesc în *osteoporoză*, fapt cu importanță în diagnosticul diferențial al proceselor de decalcifiere osoasă. Scă-

deri moderate ale AlP au fost semnalate în afecțiuni caracterizate printr-o încetinire a osificării, ca de exemplu în deficitul de vitamina C, hipotiroidism sever instalat încă din copilărie (cretinism) și în acondroplazie.

Valori deosebit de scăzute ale AlP se constată în *hipofosfatazie,* o afecțiune genetică evoluînd cu fenomene de rahitism rezistent la terapia cu vitamina D. De notat că terapia cu EDTA, administrată în cazurile de intoxicație cu plumb, inhibă activitatea AlP. Interpretarea modificărilor AlP în bolile osoase este îngreunată de faptul că această enzimă poate proveni și din ficat, activitatea sa crescînd mult în hepatopatiile colestatice. Există astăzi posibilitatea de a se diferenția, prin separări electroforetice, izoenzima AlP osoasă de izoenzimele provenite din ficat sau din intestin. Întrucît aceste tehnici nu sînt întotdeauna accesibile laboratoarelor clinice, este important de știut că în hepatopatiile colestatice, creșterea activității AlP se asociază cu nivele crescute ale altor enzime indicatoare ale colestazei, așa cum sînt γ-glutamiltransferază (γGT), 5'-nucleotidaza și aminopeptidaza (leucinaminopeptidaza, LAP), în timp ce în afecțiunile osoase, activitățile enzimelor amintite se situează în limite normale.

Dozările de fosfatază acidă (AcP) pot furniza informații complementare în bolile osoase. Se știe că AcP și mai ales izoenzima de origine prostatică (tartrat inhibabilă) crește în carcinomul de prostată, care a depășit capsula și mai ales în metastazele sale osoase. În acest fel, creșterea simultană și exprimată a AlP și AcP poate diferenția metastazele unui astfel de carcinom de alte afecțiuni ale osului. De fapt, creșterile de AcP, survenite în alte boli ale oaselor, ca de exemplu în osteopetroză (boala Albers-Schönberg), hiperparatiroidism, boala Paget, metastazele unui carcinom mamar sau în afectarea osoasă din boala Gaucher, sînt mult mai puțin exprimate decît cele care survin în metastazele osoase ale unui carcinom de prostată.

Din cele expuse se poate deduce că determinările de enzime în bolile osoase oferă posibilități limitate de diagnostic iar rezultatele pot fi interpretate doar în lumina datelor clinice și radiologice (48).

III.4.5. BOLILE PANCREASULUI

Suferințele acute sau cronice ale pancreasului survin în cele mai multe cazuri în asociere cu alte îmbolnăviri între care pe primul plan se situează litiaza biliară și alcoolismul. Din acest motiv este important de a se face o diferențiere între modificările testelor de laborator consecutive leziunilor pancreatice și cele cauzate de suferința altor organe, survenită concomitent și în strînsă legătură cu afectarea pancreasului. Așa de exemplu, deși țesutul pancreatic este bogat în γGT, creșterea activității serice a acestei enzime la un bolnav cu pancreatită acută poate fi considerată mai degrabă ca fiind de origine hepatică, ca o consecință a alcoolismului sau a unei suferințe hepatobiliare.

Același tip de hepatopatie cu caracter colestatic poate explica nivelul crescut al AlP sau al GOT și GPT care survine mai ales ca urmare a unor colici biliare, precedînd sau evoluînd concomitent cu o pancreato-

patie acută. Creşterea concentraţiei acizilor biliari serici în numeroase astfel de cazuri constituie de altfel o dovadă a intervenţiei unui reflux biliar.

Pe de altă parte, o creştere a LDH_{4-5} şi a CK-MM, la un bolnav cu o formă deosebit de gravă a pancreatitei acute, se explică în cadrul stării de şoc şi respectiv a hipoxiei musculaturii.

Singurele enzime a căror modificare poate fi pusă în legătură directă cu leziunile pancreasului sînt α-amilaza şi lipaza care trec în ser ca urmare a unei alterări a partiţiei exogen-endogene a acestor enzime (vezi pag. 194). Avîndu-se în vedere că pancreasul sintetizează zilnic cîteva grame de protein-enzime şi secretă aproximativ 1—2 litri de suc pancreatic, ar fi de aşteptat ca orice boală a pancreasului evoluînd cu o astfel de alterare a partiţiei exo-endogene să ducă la o importantă creştere în ser a enzimelor secretate de pancreas. În realitate, interpretarea modificărilor suferite de nivelul seric al enzimelor pancreatice implică o serie de dificultăţi care sînt analizate în cele ce urmează.

Pancreatita acută. Formele grave ale acestei boli se caracterizează prin autodigestia ţesuturilor pancreatice şi necroza consecutivă a parenchimului. Există însă şi numeroase cazuri în care activarea intracelulară a enzimelor pancreatice (fosfolipaza şi tripsinogenul) poate fi limitată ca extensie şi intensitate, astfel încît leziunile nu ajung pînă la forme necrotice hemoragice şi se limitează la modificări de membrană şi la edem. De fapt, multe cazuri de pancreatită acută se vindecă fără a lăsa o insuficienţă pancreatică.

Atît în formele grave cît şi în formele atenuate se constată însă o creştere în ser a α-amilazei, creştere care, la 4—5 ore de la debutul durerilor abdominale, poate ajunge la valori de cinci ori superioare celor normale iar în decurs de 24 ore poate depăşi de 10 ori limita superioară a normalului. Gradul de creştere al α-amilazei este variabil de la caz la caz şi nu s-a putut stabili o legătură certă între acest grad de creştere şi gravitatea fenomenelor clinice sau evoluţia ulterioară a bolii (25).

Datorită eliminării prin urină a amilazei, valorile anormal de crescute ale acestei enzime tind să revină spre normal deja din ziua a doua de la debutul fenomenelor acute şi doar în rare cazuri persistă mai mult de 72 ore. Măsurîndu-se însă activitatea α-amilazei în urina colectată, pe o perioadă de 24 ore, este posibil să se detecteze chiar şi creşteri cu caracter trecător ale enzimei. Din acest motiv determinările activităţii α-amilazei în urină sînt superioare ca valoare diagnostică determinărilor efectuate în ser. Menţionăm că în condiţii normale amilazuria oscilează între 200—1900 U/24 ore.

De notat că în cazurile evoluînd cu stare de şoc şi oligurie, eliminările urinare ale α-amilazei se reduc şi creşterea activităţii enzimei în ser persistă mai mult de 72 ore.

Valoarea diagnostică a determinărilor de α-amilază este limitată şi datorită faptului că activitatea serică a acestei enzime este determinată nu numai de amilaza pancreatică dar şi de cea provenită din glandele salivare. Din acest motiv, parotiditele se însoţesc de creşteri importante ale α-amilazei serice. Există însă astăzi posibilităţi de a se diferenţia izoenzima pancreatică de cea salivară prin separări electroforetice, prin rezistenţa la diverşi inhibitori sau prin adsorbţia pe schimbători de ioni.

Alte stări patologice care pot duce la creşteri ale α-amilazei serice sînt ulcerul penetrant în pancreas, ocluziile intestinale, infarctul mezenteric, colecistita acută sau administrarea de opiacee care produc adeseori un spasm tranzitoriu al sfincterului Oddi. De notat că coexistenţa unei suferinţe pancreatice trecătoare nu poate fi exclusă în condiţiile patologice menţionate.

Perturbări în procesul de eliminare pe cale urinară a α-amilazei se însoţesc de creşteri ale nivelului seric al acestei enzime, fenomen constatat în afecţiunile renale evoluînd cu reducerea filtrării glomerulare. O situaţie particulară este reprezentată de macroamilazemie cînd dimensiunile crescute ale α-amilazei previn filtrarea sa la nivelul glomerulilor. Conform unor investigaţii recente, macroamilazemia ar fi rezultatul formării unor complexe ale enzimei cu imunoglobulinele (mai ales IgA), care încetinesc eliminarea urinară a enzimei, fenomenul fiind însă lipsit de consecinţe patologice şi de semnificaţie clinică.

Menţionăm ca o curiozitate de patologie biochimică posibilitatea creşterii α-amilazei serice în sarcina extrauterină, tumori ovariene, salpingite, precum şi în sindromul paraneoplazic întovărăşind, spre exemplu, un carcinom bronşial. Mecanismele prin care se ajunge la creşterea amilazemiei în astfel de situaţii nu sînt însă pe deplin elucidate, incriminîndu-se, în unele cazuri, prezenţa de ţesut pancreatic ectopic.

Determinările de lipază serică înlătură o parte din inconvenientele menţionate ale investigării pancreasului, bazate doar pe determinări de α-amilază.

Reproducem în tabelul 3.7 cîteva din cauzele extrapancreatice ale creşterilor de α-amilază şi de lipază în ser.

Observaţiile clinice au mai relevat că în cazurile la care factorii de risc ai pancreatitei acute (de exemplu litiaza biliară, alcoolismul, hipertrigliceridemiile) persistă, atacurile de pancreatită pot căpăta un caracter recurenţial iar suferinţa pancreatică trece spre o formă cronică (1, 25).

Pancreatita cronică. Majoritatea bolnavilor cu pancreatită cronică sînt alcoolici. În cazuri mai rare, se pot incrimina hepatopatiile colestatice evoluînd cu creşteri ale nivelului plasmatic de acizi biliari. Boala are un caracter lent progresiv şi ajunge cu timpul la insuficienţă pancreatică. Diagnosticul pancreatitei cronice întîmpină dificultăţi deoarece manifestările clinice sînt necaracteristice, iar activitatea α-amilazei în ser sau urină şi lipaza serică cresc doar în cursul eventualelor atacuri recurente. De altfel chiar şi astfel de creşteri tranzitorii devin din ce în ce mai pu-

Tabelul 3.7

Cauze extrapancreatice ale creşterii activităţilor serice ale amilazei şi lipazei. + — activitate crescută; — activitate normală; * afectarea pancreasului nu poate fi exclusă; ** — asocierea unei pancreatite secundare duce şi la creşterea lipazei.

	ulcer perforat*	ileus*	infarct* mezenteric	colecistită* acută	Parotidită**	Insufic. renală	Macroamilazemie	Sarcină extrauterină	Sindrom paraneoplazic
α-amilază	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Lipază	+	+	+	+	—	+	—	—	—

ţin exprimate pe măsură ce parenchimul pancreatic este înlocuit de ţesut scleros. În principiu ar trebui ca o astfel de insuficienţă funcţională să ducă la scăderi ale α-amilazei în ser, cel puţin în intervalele de timp dintre eventualele pusee evolutive. În realitate, aceste scăderi sînt puţin exprimate şi fără importanţă diagnostică. Nu trebuie uitat de altfel că mai bine de două treimi din α-amilaza serică este provenită din glandele salivare, astfel încît o eventuală scădere a componentei pancreatice are un efect minor asupra activităţii globale a serului. Dozările selective ale izoenzimei pancreatice sau determinările lipazei serice ar putea detecta chiar şi stările de hipoenzimie consecutive reducerii parenchimului pancreatic. Insuficienţa secretorie a pancreasului poate fi însă evaluată mai obiectiv prin determinarea cantitativă a enzimelor secretate în sucul duodenal pe unitatea de timp în urma stimulării maximale cu secretină-pancreozimină sau prin dozarea chimotripsinei în materiile fecale (1, 25).

Insuficienţa pancreatică poate fi cauzată nu numai de pancreatitele cronice dar şi de alte procese patologice, ca de exemplu fibroza chistică a pancreasului, stările de carenţă severă în proteine (Kwashiorkor), hemocromatoze, carcinoame ale pancreasului sau ale regiunii ampulare precum şi deficitele cu caracter genetic afectînd sinteza diferitelor enzime pancreatice (1).

Carcinomul de pancreas. Atunci cînd carcinomul cuprinde capul pancreasului şi determină fenomene de colestază extrahepatică sau în caz de metastaze hepatice ale unui astfel de carcinom, creşterea în ser a enzimelor indicatoare ale colestazei, ca de exemplu AlP şi γGT (vezi pag. 222), este deosebit de exprimată. Nivelul seric al enzimelor produse de pancreas, respectiv amilaza şi lipaza se modifică însă în mod nesemnificativ în carcinoamele pancreatice chiar şi atunci cînd procesul duce la obstrucţia ductului pancreatic. Astfel de rezultate negative se datoresc mai ales atrofiei ţesutului pancreatic (1, 25).

III.4.6. BOLILE FICATULUI ŞI CAILOR BILIARE

Suferinţele ficatului constituie principalul domeniu de aplicare diagnostică al determinărilor de enzime serice şi ridică totodată cele mai complexe probleme de fiziopatologie legate de comportarea acestor enzime.

În esenţă, determinările de enzime serice pot oferi informaţii cu privire la următoarele aspecte ale patologiei hepatice:

1) Detectarea unei creşteri patologice a permeabilităţii membranei hepatocitului;

2) Depistarea unei insuficienţe a funcţiei proteosintetice a ficatului;

3) Indicii cu privire la existenţa unui proces de colestază;

4) Indicii cu privire la o eventuală inducere de enzime.

III.4.6.1. CREŞTEREA PERMEABILITĂŢII MEMBRANEI CELULELOR HEPATICE

Un astfel de proces poate fi detectat pe baza creşterii în ser a enzimelor celulare ca de exemplu AST (GOT), ALT (GPT), LDH (izoenzimele 4—5) şi GLDH. Există şi alte enzime celulare al căror nivel creşte

Tabelul 3.8

Comportarea unor enzime celulare (AST, ALT, GLDH) în diferite forme clinice ale unor boli hepatice în funcție de gradul, extinderea și viteza de instalare ale leziunilor. Exemplele numerice au doar un caracter orientativ și nu pot fi absolutizate. Valorile LDH sînt trecute doar în afecțiunile în care prezintă creșteri importante.

Gradul de afectare a hepatocitului	Moderat			Sever	Relativ sever	Sever	Sever
Numărul de celule afectate	mare			mare	variabil	relativ mai redus	redus
Viteza procesului	rapidă			rapidă	relativ lentă	relativ mai lentă	lentă
Nivelul seric al enzimelor	mult crescut			foarte mult crescut	moderat crescut	moderat crescut	puțin crescut
Exemplu de boală	Hepatită acută			Intoxicație acută (ciuperci, CCl_4)	Hepatită cronică progresivă	Ciroză hepatică activă	Ciroză hepatică „stinsă"
	anicterică	icterică	necrotizantă				
Exemple numerice AST (U/l)	180	400	1600	3500	122	80	20
ALT (U/l)	300	600	1200	2600	82	40	8
GLDH (U/l)	4	11	74	1000	7	3	1
			LDH 550	LDH 4000			

în ser în caz de leziuni hepatice, așa cum sînt ornitincarbamiltransferaza (OCT), izocitratdehidrogenaza (ICDH) și sorbitoldehidrogenaza (SDH) care sînt mai rar utilizate în laboratorul clinic, deși unele din ele (OCT, SDH) sînt considerate ca fiind mai specifice pentru parenchimul hepatic. Mecanismele intime care duc la creșterea în ser a enzimelor celulare și factorii de care depinde gradul acestei creșteri au fost prezentate anterior (vezi pag. 194).

Actualizînd datele de patologie hepatică este important de arătat că diferitele boli ale ficatului realizează condiții particulare care diferă în funcție de etiologia și stadiul evolutiv al hepatopatiei (vezi tabelul 3.8).

Așa cum reiese și din tabelul 3.8, alături de creșterea în ser a enzimelor celulare, în diversele boli ale ficatului se produc și modificări ale

raporturilor dintre activitățile diverselor enzime. Așa de exemplu, în timp ce la subiecții sănătoși raportul GOT/GPT sau așa-zisul raport DeRitis este de aproximativ 1,3, în cazurile comune de hepatită virală, acest aport devine subunitar, crescînd însă atunci cînd leziunile capătă un caracter necrotizant care se trădează și prin creșterea deosebit de exprimată a GLDH (1, 36, 37).

Aceste „distorsiuni" ale raportului GOT/GPT pot fi explicate prin mai multe mecanisme. Se consideră astfel că în cazul unor leziuni moderate ale hepatocitelor care afectează doar permeabilitatea membranei celulare, scurgerea din celule interesează cu predominanță enzimele cu localizarea strict citosolică, așa cum este GPT, pe cînd în cazul unor leziuni severe cu caracter necrotizant se eliberează din celule și enzimele mitocondriale ca de exemplu GLDH, iar GOT (AST) cu localizare biloculară (citosolică și mitocondrială) crește mai mult decît GPT (ALT).

Pe de altă parte, s-a arătat (40) că GPT se află în concentrații mai mari în special în celulele de la periferia lobulilor hepatici care sînt mai rapid afectate de procesele inflamatorii care debutează, de regulă, în spațiile Kiernan, respectiv în țesutul conjunctiv interlobular. După aceiași autori, GLDH s-ar găsi în mai mare abundență în zonele centrale ale lobului hepatic care sînt afectate atunci cînd survine o necroză mai extinsă (peace meal necrosis). Un al treilea mecanism în măsură să explice creșterea mai accentuată a GPT în formele ușoare și medii de hepatită acută este reprezentat de persistența mai îndelungată în ser a acestei enzime care are un timp de înjumătățire (T/2) mai lung decît GOT (40).

În opoziție cu GPT, izoenzimele LDH_{4-5} se află localizate mai ales în celulele aflate în jurul venei centrolobulare astfel încît, în principiu, procesele de stază hepatică ar trebui să ducă la creșteri ale acestor izoenzime. În realitate, datorită eliminării relativ rapide din plasmă a izoenzimelor LDH_{4-5} (vezi pag. 197), astfel de creșteri se întîlnesc doar în caz de insuficiență acută a inimii drepte (de exemplu într-o embolie pulmonară), precum și în condițiile unui proces necrotic cu caracter supraacut, așa cum survine mai ales în intoxicațiile acute (vezi tabelul 3.8). În alte forme clinice ale bolilor hepatice, determinările de LDH au o valoare diagnostică redusă și nu este cazul să fie solicitate ca o analiză de rutină (1).

De asemenea, determinările de ornitincarbamiltransferază (OCT) își găsesc o aplicare în practică doar atunci cînd asociațiile morbide, respectiv leziuni multiple în diverse organe, îngreunează interpretarea modificărilor care afectează enzimele serice utilizate în mod obișnuit în laboratoarele clinice (39, 40). Prezentăm în fig. 3.23 comportarea GOT și GPT în cîteva hepatopatii caracteristice.

O stare patologică particulară caracterizată prin creșterea simultană în ser a enzimelor celulare hepatice (GOT, GPT, GLDH, OCT), a celor musculare (CK) precum și a α-amilazei și lipazei se întîlnește în așa-numitul sindrom Reye. Sindromul apare la copii și este compus din două faze, o fază infecțioasă (gripă sau varicelă), urmată după cîteva zile de vărsături și encefalopatie, asociată cu modificările menționate ale enzimelor serice și de creșterea în plasmă a acizilor organici (lactic, piruvic, acetoacetic) și a acizilor aminați. Întrucît examenul histochimic evidențiază o scădere a enzimelor mitocondriale în țesuturi, sindromul Reye ridică problema unei lezări generalizate a mitocondriilor.

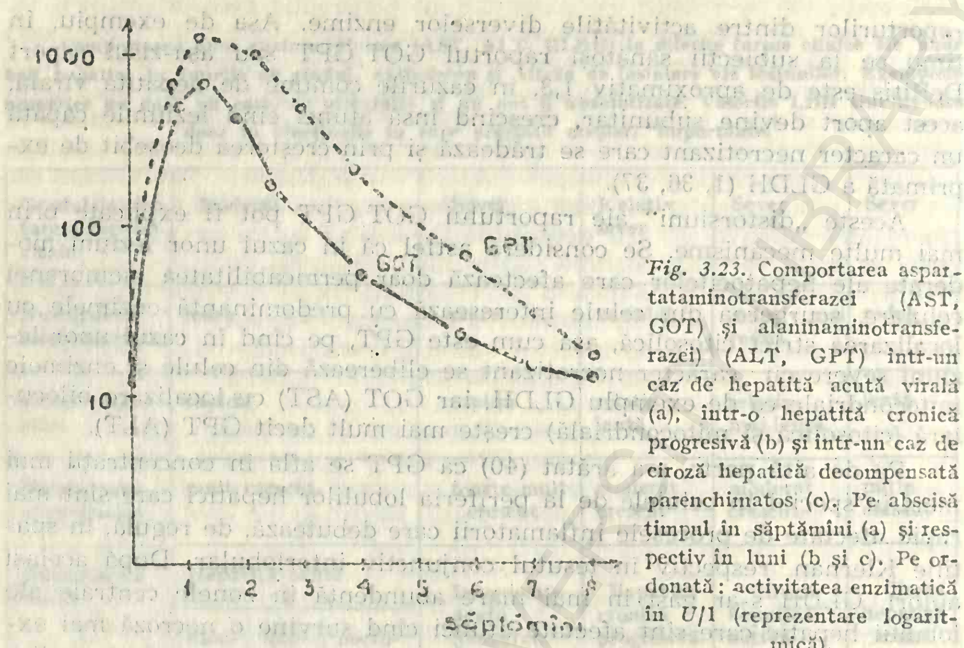


Fig. 3.23. Comportarea aspartataminotransferazei (AST, GOT) și alaninaminotransferazei) (ALT, GPT) într-un caz de hepatită acută virală (a), într-o hepatită cronică progresivă (b) și într-un caz de ciroză hepatică decompensată parenchimatos (c). Pe abscisă timpul în săptămîni (a) și respectiv în luni (b și c). Pe ordonată: activitatea enzimatică în U/l (reprezentare logaritmică).

III.4.6.2. CAPACITATEA DE SINTEZĂ A HEPATOCITELOR

Această funcţie poate fi evaluată prin dozarea enzimelor şi, în general, a proteinelor secretate activ de către ficat în plasmă. Aşa cum s-a arătat în capitolul precedent, cu excepţia imunoglobulinelor, marea majoritate a proteinelor plasmatice este sintetizată de către hepatocite. Este bine de a preciza însă de la bun început că nivelul plasmatic al unei enzime sau proteine secretate de ficat depinde nu numai de viteza de sinteză dar şi de viteza de degradare. Din acest motiv, concentraţia în plasmă a unei enzime sau proteine de secreţie hepatică furnizează doar o imagine aproximativă asupra capacităţii de sinteză a ficatului. Aşa de exemplu, proteinele care sînt rapid catabolizate, după formarea de complexe, aşa cum sînt haptoglobina şi proteina C_3 a complementului nu sînt potrivite pentru evaluarea funcţiei hepatice, deşi nivelul lor plasmatic poate să scadă din cauza unui deficit de sinteză (39).

Indicatorii cei mai utilizaţi pentru depistarea unei reduceri a proteosintezei hepatice sînt colinesteraza serică (CHE) şi factorii coagulării dependenţi de vitamina K. La aceşti indicatori enzimatici s-ar mai putea adăuga unele proteine cum sînt albumina serică şi prealbumina (1, 21, 37).

Pentru decelarea unei insuficienţe hepatice care se instalează brusc, sînt de preferat proteinele şi enzimele caracterizate printr-o viteză de remaniere accelerată (turnover rapid) aşa cum sînt prealbumina ($T/2 < 2$ zile) şi factorul VII al coagulării (T/2 de cîteva ore), în timp ce deficitul cronic al proteosintezei din ciroza hepatică se evidenţiază mai bine prin scăderea proteinelor şi enzimelor cu un turnover mai lent, ca de exemplu albumina serică (T/2 aproximativ 20 de zile) sau CHE (T/2 aprox. 14 zile).

Confirmînd datele autorilor germani (1, 37, 58), observaţiile efectuate în laboratorul nostru (5,9) ne-au convins de utilitatea determinărilor seriate de CHE, care constituie unul din puţinele teste hepatice cu valoare prognostică. De fapt, aşa cum se vede din fig. 3.24, scăderea progresivă a acestei enzime indică o evoluţie nefavorabilă, iar valorile situate la aproximativ 10% din media normalului atrag atenţia asupra pericolului comei hepatice. Totodată, gradul de scădere al CHE într-o ciroză hepatică este mai accentuat decît cel al albuminei serice sau al complexului protrombinic. Aşa de exemplu, într-o ciroză hepatică decompensată parenchimatos, scăderea albuminei serice ajunge rareori sub 60% din valorile normale, iar indicele protrombinic sub 50%, în timp ce activitatea CHE se prăbuşeşte la valori de 20—30% din media normalilor. Pe de altă parte, în cazurile de comă hepatică instalată rapid la un bolnav cu hepatită acută necrotizantă sau într-o intoxicaţie cu ciuperci, decesul poate surveni la o valoare a CHE de aproximativ 50% din valoarea medie a normalilor, pe cînd factorul VII al coagulării şi implicit timpul de protrombină pot ajunge la 10%.

Nu trebuie uitat apoi că scăderea albuminei şi prealbuminei se pot datora nu numai unui deficit de sinteză ci şi ca urmare a unei distribuţii anormale, trecînd, de exemplu, în lichidul de ascită, într-un caz de ciroză sau în flictenele unui bolnav cu arsuri extinse, iar pe de altă parte putîndu-se pierde pe cale urinară, în caz de proteinurie masivă. Mecansimele amintite nu afectează însă comportarea CHE care, avînd o greutate

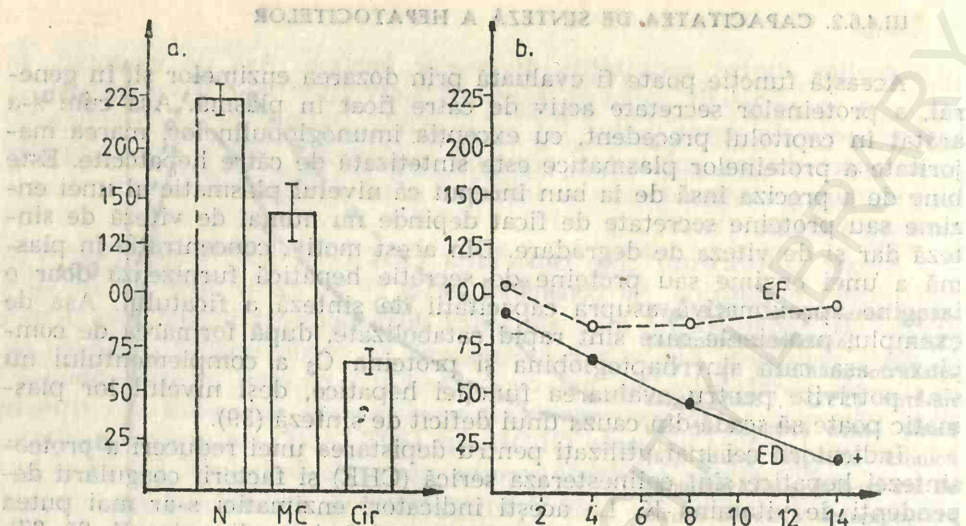


Fig. 3.24. a) Valorile medii ale activității CHE serice (în μmol/ml/h) la normali (N) în hepatita cronică activă (MC) și în ciroza hepatică (Cir). b) Comportarea CHE în cursul evoluției unor cazuri de ciroză hepatică. ED — bolnav cu evoluția defavorabilă spre comă hepatică și exit ; EF — bolnav cu evoluție relativ favorabilă.

Tabelul 3.9

Diversele stări patologice și situații care pot duce la scăderea sau respectiv la creșterea activității serice a colinesterazei (CHE)

Scăderi	*Creșteri*
— Insuficiență hepatică — Ficat de stază — Denutriție proteică — Malabsorbție — Anemii severe, mai ales anemii megaloblastice (vezi p. 207) — Hipotiroidism sever — Reacție de fază acută (infecții acute, postoperator, infarct miocardic) — Impregnare tumorală — Terapie cu L-asparaginază (vezi pag. 210) — Terapie cu ciclofosfamidă — Intoxicații cu pesticide organofosforice — Sarcină (scădere fiziologică) — Contraceptive orale — Scăderi cu caracter genetic	— Perioada de vindecare a unei hepatite acute — Sindromul nefrotic (vezi p. 151) — Obezitate (mai ales androidă) — Diabet cu supragreutate — Hiperlipoproteinemie tip II b sau IV (vezi pag. 44) — Hipertiroidism fără cașexie
Scăderile activității CHE pot fi datorate fie deprimării capacității de sinteză, fie unei modificări a reglării sintezei, fie unei inhibări a enzimei, ca de exemplu în cazurile de intoxicații cu organofosforice.	Creșterile activității CHE pot fi în genere atribuite unei stimulări a sintezei de enzimă, care pot surveni fie cu un caracter relativ specific, fie în cadrul unei accelerări oarecum generale a sintezei de proteine în ficat.

moleculară mult mai mare decît albumina, rămîne în compartimentul vascular.

Pentru a se putea evalua valoarea diagnostică și limitele determinărilor de CHE în bolile hepatice reproducem în tabelul 3.9 diversele situații care pot duce la o scădere sau respectiv la o creștere a nivelului seric al acestei enzime.

Este important de precizat că în multe situații reducerea nivelului seric a CHE nu se datorește unei insuficiențe de sinteză ci doar unor variații în reglarea procesului de sinteză. Așa de exemplu, în reacții de fază acută, sub efectul unor modificări hormonale, are loc un fel de comutare a sintezelor de proteine în ficat, astfel încît nivelul unor enzime între care CHE, LCAT și factorul XIII scade, în timp ce producția proteinelor de fază acută (α_1 antitripsină, fibrinogen, α_1 seromucoid) crește. Revenirea la normal a spectrului proteinelor și enzimelor de secreție hepatică după rezolvarea procesului acut denotă caracterul tranzitoriu al variației de reglare și exclude prezența unei insuficiențe a capacității de sinteză. De asemenea, scăderile CHE serice survenite într-un caz de denutriție sau într-o anemie megaloblastică se normalizează după o alimentație corespunzătoare, respectiv după terapia eficientă cu vitamina B_{12} (11).

Spre deosebire de situațiile menționate, în bolile hepatice, scăderea CHE se datorește unei reale alterări a capacității de sinteză a hepatocitelor, corelîndu-se cu alte teste funcționale hepatice (BSP, galactozurie provocată, clearance al antipirinei) și avînd tendința de revenire spre normal doar în măsura în care se reface parenchimul hepatic. De altfel, gradul de scădere al CHE serice într-o ciroză hepatică este mai accentuat decît cel survenit într-o reacție de fază acută, în sarcină sau după terapia cu anticoncepționale orale.

O mențiune specială merită însă acordată scăderilor cu caracter genetic ale activității CHE consecutive producerii unei variante de enzimă inactivă față de oricare din substratele cunoscute ale CHE. În astfel de situații, depistarea unei activități deosebit de scăzute a CHE (practic nulă la homozigoți și de aproximativ 50—60% din activitatea normală la heterozigoți) constituie o surpriză de laborator și contrastează cu starea generală a subiecților și cu lipsa altor semne de afectare hepatică (aminotransferazele, albumina serică, testele de traversare hepatică și testele de coagulare fiind normale). Această anomalie ca și existența altor variante atipice (dibucainrezistentă, flururorezistentă) nu sînt însă lipsite de interes clinic deoarece, spre deosebire de CHE normală, variantele atipice nu sînt capabile să hidrolizeze succinilcolina, un preparat folosit în anestezie ca relaxant al musculaturii. Din acest motiv, administrarea succinilcolinei la subiecții cu anomalii ale CHE sau la bolnavii hepatici cu valori mult scăzute ale acestei enzime este urmată de o perioadă prelungită de apnee.

Creșterile activității CHE constatate la obezi, hiperlipemici, diabetici (8, 9) sau la hipertiroidieni (43, 46) pot fi puse în legătură cu accelerarea proceselor de turnover a lipoproteinelor și proteinelor hepatice, cu un eventual efect inductor al unor hormoni sau cu un posibil rol specific al CHE în hidroliza esterilor colinei cu acizii grași și în special a butirilcolinei. Întrucît butiril-CoA reprezintă o răspîntie pe căile de sinteză sau de degradare a acizilor grași, Clintherow și colab. (4) consideră că, în cursul accelerării acestor procese, ar putea rezulta butirilcolină care reprezintă un produs inutil, dacă nu chiar toxic și care este substratul preferențial al CHE.

Creșterea CHE în condițiile patologice amintite ar reprezenta un exemplu de inducere prin exces de substrat. Pentru hepatologie este important de știut că în caz de afectare a ficatului la obezi, hiperlipemici sau hipertiroidieni, scăderea CHE pornește de la un nivel inițial mai ridicat.

O situaţie cu totul particulară (pe care nu am trecut-o în tabelul 3.9 spre a nu creia confuzii) este reprezentată de hepatocarcinomul evoluînd cu valori mult crescute ale CHE (41) şi în care se poate bănui o dereglare a represiei enzimei. Astfel de cazuri încadrabile în sindromul paraneoplazic sînt însă extrem de rare, constituind mai degrabă o curiozitate de patologie biochimică. În marea majoritate a proceselor tumorale maligne şi în special în neoplasmele primitive sau secundare ale ficatului, nivelul CHE scade (28, 42).

III.4.6.3. ENZIME CARE INDICĂ UN PROCES DE COLESTAZĂ

Perturbarea proceselor implicate în formarea şi curgerea bilei pot surveni începînd de la polul biliar al hepatocitului şi pînă la sfincterul lui Oddi. Astfel de procese se repercută mai curînd sau mai tîrziu asupra funcţiei hepatocitare. Alături de creşterea bilirubinei conjugate şi a acizilor biliari, colestaza se trădează şi prin creşterea în ser a unor enzime cum sînt fosfataza alcalină (AlP), γ-glutamiltrasferaza (γGT), 5-nucleotidaza (5NT) şi aminopeptidaza (leucinaminopeptidaza, LAP).

În practica clinică se utilizează mai ales primele două enzime şi este important de precizat că nivelul lor creşte chiar şi în formele minore de colestază atunci cînd nivelul bilirubinei conjugate poate fi normal sau prezintă doar o creştere abia schiţată (48).

Aşa cum s-a mai arătat (vezi pag. 211). AlP poate creşte şi în bolile osoase însoţite de o reacţie osteoblastică şi, uneori, în boli ale intestinului. Prin determinarea izoenzimelor AlP se poate preciza provenienţa creşterii activităţii acestor enzime în ser. În orice caz, prin excluderea unei boli osoase şi mai ales atunci cînd creşterile de AlP se însoţesc de nivele ridicate ale γGT, 5NT sau LAP se poate afirma existenţa unui proces colestatic intra- sau extrahepatic.

De notat că AlP creşte adeseori în cursul gravidităţii (probabil provenind din placentă), iar atunci cînd nu este însoţită de o creştere a γGT nu poate fi interpretată ca fiind o expresie a colestazei.

O enzimă care şi-a cîştigat în ultimul deceniu un loc important în hepatologie este γGT. Enzima se găseşte în hepatocite aproape exclusiv sub formă legată de membrane şi mai ales de membrana plasmatică a canaliculilor biliari, intervenind în transportul transmembranal al aminoacizilor (17,20).

Pentru problemele care interesează clinica este important să se precizeze măsura în care determinările activităţii acestei enzime pot fi utilizate în diagnosticul pozitiv şi diferenţial al bolilor hepatice. În acest sens, este necesar de precizat că determinarea γGT constituie un test extrem de sensibil pentru detectarea unei suferinţe hepatice, constatîndu-se valori crescute în peste 93% a cazurilor. Din acest motiv s-ar putea deduce că valoarea ei în privinţa diferenţierii diverselor forme clinice ale suferinţelor hepatice este limitată. În realitate, gradul de creştere al γGT variază foarte mult în funcţie de natura hepatopatiei iar la interpretarea rezultatelor trebuie să se ţină seama tocmai de acest grad de creştere.

Sindroamele colestatice constituie starea patologică în care survin cele mai frecvente şi totodată cele mai importante creşteri ale γGT (17, 20, 30). Astfel, în timp ce AlP creşte în aceste condiţii la valori de 3—10 ori limita superioară a normalului, γGT depăşeşte aceste limite de 10—50 de ori (cea mai ridicată valoare întîlnită în laboratorul nostru a

fost de 2600 U/l reprezentînd o creștere de mai bine de 100 de ori față de limita superioară a normalului). De notat că nivelul γ-GT rămîne în limite normale în bolile osoase. Este însă important să se facă următoarele două precizări:

Determinările de γGT nu pot face diferențierea între colestaza intrahepatică și cea extrahepatică și nici nu sînt în măsură să stabilească caracterul malign al unui proces de colestază;

Creșterea enzimei în sindromul colestatic nu se datorește unei lipse de eliminare prin bilă, γGT nefiind o enzimă de excreție.

Mecanismele care duc la creșterea γGT în colestază acționează în primul rînd prin stimularea sintezei acestei enzime cu localizarea membranală. La mecanismul descris anterior se mai adaugă efectul dizolvant al acizilor biliari tensioactivi asupra membranelor lipoproteice avînd drept urmare o eliberare de proteine din membrană (20).

Mecanismele amintite ar putea explica observațiile clinice după care nivelul crescut al γGT persistă săptămîni și chiar luni după dezobstrucția chirurgicală a căilor biliare.

S-a mai sugerat că cel puțin în cazul colestazelor intrahepatice, aceiași agenți care declanșează procesul de colestază, acționează și ca inductori ai sintezei de γGT și de AlP (20). De notat că leptospiroza icterohemoragică (boala Weil) evoluează cu un pronunțat caracter colestatic și se însoțește de creșteri deosebit de exprimate ale AlP și mai ales ale γGT.

Leziunile toxice ale ficatului pot duce și ele la creșteri importante ale γGT. În cazul intoxicațiilor cu solvenți organici (de exemplu CCl_4), creșterile de γGT sînt mai puțin importante decît creșterea aminotransferazelor (AST, ALT) sau a LDH. În unele hepatopatii induse prin medicamente, de exemplu în cea cauzată de clorpromazină, tabloul clinic și biochimic capătă un aspect colestatic iar γGT și AlP cresc aproximativ în egală măsură (21).

O situație deosebită este reprezentată de consumul cronic de alcool sau de tratamentul îndelungat cu anticonvulsivante (fenobarbital sau fenitoină). Creșterile activității serice a γGT sînt relativ moderate în tratamentul cu anticonvulsivante în timp ce la alcoolici nivelul seric al γGT poate ajunge pînă la peste 1000 U/L (aproape de 50 ori limita superioară a normalului), pe cînd activitatea AlP depășește rareori dublul valorilor normale (20). Gradul de creștere al γGT la un alcoolic variază de la caz la caz și nu depinde în mod direct de cantitatea de alcool consumată ci mai degrabă de persistența îndelungată a consumului (10).

S-a mai arătat că o încărcare suplimentară cu alcool la un caz de alcoolism cronic produce în decurs de 24 ore o creștere și mai accentuată a nivelului seric de γGT, în timp ce o aceeași încărcare cu alcool are efecte minime la un subiect sănătos care consumă alcool doar în mod ocazional.

Pe de altă parte, oprirea consumului de alcool de către un subiect alcoolic duce la o scădere progresivă a activității serice a γGT (10). Acest fapt contribuie la diferențierea modificărilor survenite la un alcoolic față de cele constatate într-o colestază intrahepatică (de exemplu o ciroză biliară), la care activitatea γGT se menține în mod persistent crescută, sau într-un caz de neoplasm hepatic la care nivelul γGT crește progresiv (vezi fig. 3.25 și 3.26).

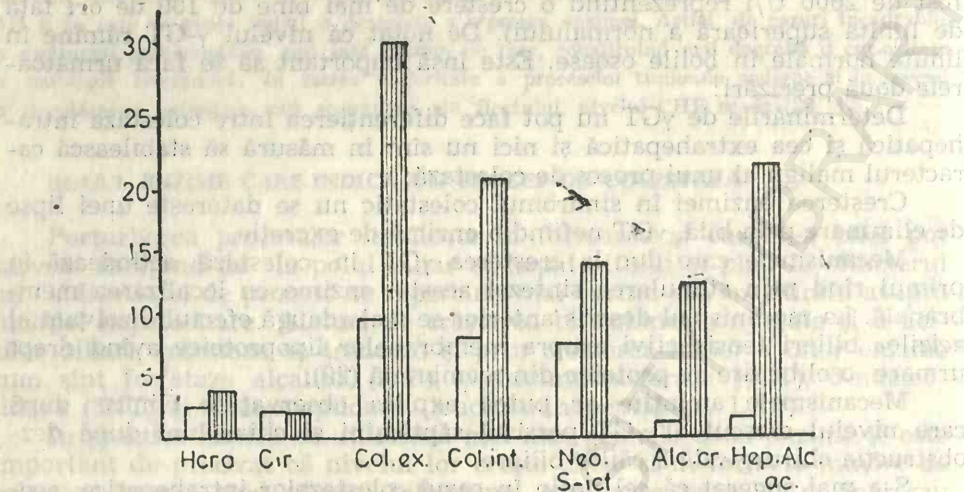


Fig. 3. 25. Comportarea fosfatazei alcaline (coloane albe) și γ-glutamiltransferazei (coloane hașurate) în hepatita cronică activă (H_{cra}) ciroză hepatică (Cir), colestază extrahepatică (Col. ex), colestază intrahepatică (Col. int), neoplasm hepatic primar sau metastatic evoluind fără icter (Neo S. ict), în alcoolismul cronic (Alc. cr) și în hepatita alcoolică acută survenită pe un fond de alcoolism cronic (Hep. alc. ac). Pe ordonată, activitățile enzimatice în multipli ai limitei superioare a normalilor.

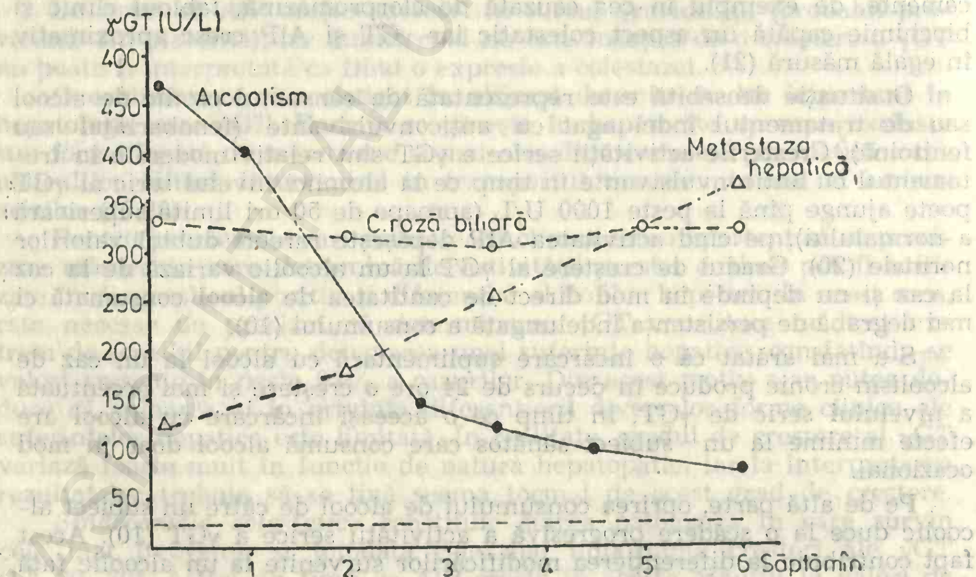


Fig. 3.26. Comportarea γ-glutamiltransferazei în cursul evoluției unui bolnav alcoolic la încetarea consumului de alcool, a unui caz de ciroză biliară, precum și a unui caz de metastaze hepatice ale unui carcinom gastric evoluind fără icter.

Pe baza datelor de mai sus se poate afirma că în comparaţie cu alte enzime, γGT joacă un rol important în recunoaşterea şi aprecierea evoluţiei unei hepatopatii alcoolice.

De notat că în condiţiile unei alterări grave a proteosintezei hepatice (valori de CHE în jur de 20% din media normalilor), ca de exemplu în stadiul terminal al unei ciroze alcoolice, activitatea serică a γGT nu mai prezintă nivele atît de ridicate şi depăşeşte rareori valoarea de 100 U/L (42).

Există dovezi după care creşterea în ser a γGT la alcoolici şi la subiecţii trataţi timp îndelungat cu barbiturice se însoţeşte şi de o sporire a concentraţiei de enzimă în celulele hepatice şi mai ales în microzomi. Aceste constatări sugerează că sub acţiunea alcoolului şi a fenobarbitalului are loc o creştere a sintezei hepatice de γGT, din care o anumită fracţiune trece în ser (17, 20). Procesul reprezintă un exemplu de *inducere de enzimă* iar nivelul seric al γGT devine un indicator al unui astfel de mecanism. Detalii privind inducerea de enzime precum şi semnificaţia acestui proces au fost prezentate anterior (vezi pag. 190).

Tumorile maligne ale ficatului (primare sau metastatice) se însoţesc de creşteri importante şi progresive ale fosfatazei alcaline (AlP) şi mai ales γ-glutamiltransferazei (γGT). În cazurile în care tumoarea comprimă sau obstruează coledocul şi care evoluează cu sindromul colestazei, creşterea AlP şi γGT se produce prin acelaşi mecanism ca şi în icterele mecanice litiazice.

În numeroase alte cazuri de tumori hepatice neinsoţite de icter se pot constata însă creşteri importante ale AlP şi γGT (28), care pot fi cu greu explicate doar printr-o perturbare cu caracter localizat în procesul de formare a bilei. Mai mult chiar, există unele indicii după care gradul de creştere al γGT în ser depinde de natura, respectiv de provenienţa metastazelor. Aşa de exemplu, în cele două cazuri de carcinoid, urmărite în ultimii doi ani în clinica I Medicală din Cluj-Napoca, nivelul γGT s-a situat la valori sub 100 U/l şi respectiv, sub 50 U/l în ciuda metastazelor hepatice masive şi a unei hepatomegalii exprimate, pe cînd valorile activităţii serice ale enzimei cresc relativ rapid la peste 300 U/l în metastazele unor carcinoame gastrice sau pancreatice, chiar dacă aceste metastaze nu evoluează cu icter. Se poate bănui doar că anumite celule tumorale elaborează produşi care stimulează sinteza de γGT în parenchimul hepatic învecinat. Oricare ar fi mecanismul intim de producere, creşterea progresivă a activităţii γGT în absenţa icterului poate sugera un proces hepatic malign (mai frecvent metastatic). Valoarea acestei examinări este cu atît mai mare cu cît creşterile enzimei survin adeseori înainte ca metastazele să atingă dimensiunile decelabile prin ecografie sau scintigrafie hepatică.

Alte afecţiuni ale ficatului (hepatita cronică, ficat de stază cardiacă) pot duce şi ele la creşteri ale activităţii serice a γGT dar astfel de creşteri depăşesc arareori 100 U/l.

Creşteri moderate (pînă la dublul limitei superioare a normalilor) se întîlnesc la bolnavi cu hipertrigliceridemie, chiar dacă nu sînt consumatori cronici de alcool (8, 27), fenomenul putînd fi eventual explicat prin tendinţa la infiltraţie grăsoasă a ficatului şi accelerarea compensatorie a procesului de sinteză şi export a lipoproteinelor precum şi a unor enzime de secreţie hepatică (vezi pag. 192). Intensificarea proceselor metabolice şi a vitezei de turnover a proteinelor sau un eventual efect inductor direct al hormonilor tiroidieni ar putea explica şi creşterea moderată a γGT (15) ca şi a CHE (46), la hipertiroidieni.

Diferitele aspecte, realizate de asocieri ale modificărilor afectînd diferitele tipuri de enzime (celulare, de secreţie sau indicatoare ale colestazei respectiv ale unei inducerii enzimatice), în diverse forme clinice ale bolilor hepatice, sînt prezentate în capitolul următor (vezi pag. 232) împreună cu alte investigaţii de laborator utilizate în hepatologia clinică.

III.4.7. DEFECTE ENZIMATICE FAMILIALE

Noţiunea de „eroare înnăscută de metabolism" a fost introdusă în 1908 de medicul britanic Archibald Garrod care a sugerat că la baza acestor anomalii metabolice cu caracter familial stă un deficit enzimatic condiţionat genetic. Ipoteza lui Garrod s-a dovedit surprinzător de corectă, iar astăzi s-au identificat numeroase boli cauzate de un deficit enzimatic specific care la rîndul său este consecutiv unei modificări în gena de structură care codifică sinteza respectivei enzime. În principiu, fiecare din cele 2000 de enzime identificate pînă în prezent ar putea suferi modificări de structură consecutive relativ frecventelor mutaţii care survin în populaţie. Din fericire nu orice mutaţie şi respectiv nu orice modificare în structura unei anumite enzime îi afectează funcţia. Pe de altă parte, anomaliile produse prin mutaţii sînt transmise de obicei prin mecanismul mendelian recesiv astfel încît boala clinic manifestă apare doar la homozigoţi, adică la subiecţii care au moştenit gena patologică de la ambii părinţi. Heterozigoţii, care au moştenit o alelă normală de la unul din părinţi, sînt aparent sănătoşi, întrucît, deşi activitatea enzimei respective este mai scăzută decît la normali, ea este totuşi suficientă pentru a preveni instalarea unor anomalii severe de metabolism.

Cu toate acestea, defectele enzimatice, avînd drept implicaţii o serie de anomalii metabolice şi funcţionale, nu sînt chiar atît de rare iar perfecţionarea metodelor de investigaţie a facilitat mult detectarea şi elucidarea unor astfel de cazuri (19).

Descrierea şi chiar enumerarea tuturor deficitelor enzimatice cu implicaţii metabolice ar depăşi cadrul acestui capitol. Astfel de deficite sînt, de regulă, descrise în legătură cu patologia metabolismului (de exemplu, în legătură cu metabolismul lipidic, glucidic etc.). Ne vom limita aici doar la cîteva generalităţi cu privire la: posibilităţi de detectare a deficitelor enzimatice; modalităţile diferite prin care mutaţia poate duce la un deficit enzimatic; modalităţile prin care un deficit enzimatic poate produce manifestări patologice.

Detectarea deficitelor enzimatice întîmpină adeseori dificultăţi deoarece, în marea lor majoritate, procesele metabolice au loc în celule iar studierea umorilor organismului furnizează doar relaţii indirecte. De fapt, determinarea în ser a unor enzime celulare cum ar fi GOT, GPT, LDH nu furnizează indicii cu privire la eventuale dereglări ale proceselor metabolice catalizate de aceste enzime.

Situaţia este diferită în cazul enzimelor care se secretă activ în plasmă şi care sînt active în plasmă (enzime plasmatice funcţionale). În astfel de situaţii, constatarea *unei scăderi în plasmă* a LCAT şi a enzimelor coagulării sau a CHE este revelatoare, iar după excluderea unor posibile anomalii cu caracter secundar (de exemplu, o insuficienţă hepatică) şi, eventual, prin detectarea aceluiaşi deficit de enzimă la alţi membri ai familiei, se poate afirma caracterul genetic al deficitului. Tot prin determinarea în plasmă, după o prealabilă injectare intravenoasă de heparină se poate decela şi un eventual deficit de lipoproteinlipază.

Alte deficite enzimatice se trădează prin *lipsa enzimei în eritrocite.* Aşa este cazul în unele boli hemolitice cu caracter familial (deficit de

hexokinază, piruvatkinază, glucozo-6-fosfat dehidrogenază, fosfohexozo-izomerază).

De cele mai multe ori este însă nevoie de dozări ale activităţilor enzimatice în fragmente de ţesuturi obţinute intraoperator sau prin puncţie biopsie. Tehnicile de dozare a enzimelor din ţesuturi sînt însă relativ dificil de standardizat, iar exprimarea rezultatelor se face raportîndu-se activitatea enzimatică la gram de ţesut sau la mg de proteină din ţesutul analizat. Din aceste motive se recomandă ca abordarea problemei, care depăşeşte competenţa laboratorului clinic, să fie lăsată în seama unor laboratoare profilate pe genetică.

Indicii indirecte asupra unui deficit enzimatic se pot obţine însă şi în mod indirect prin detectarea unor acumulări ale substratului enzimei deficitare şi, respectiv, prin găsirea unor scăderi a produşilor de reacţie Aşa de exemplu, în deficitul de fenilalaninhidroxilază, care cauzează idioţia fenilpiruvică, se constată o creştere a concentraţiei de fenilalanină în umorile organismului, iar în deficitul de LCAT scad esterii de colesterol şi lizolecitina (produşii de reacţie) şi cresc colesterolul liber şi lecitina (substratele).

Consecinţele mutaţiei asupra activităţii enzimatice pot lua următoarele aspecte:

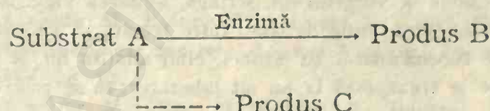
1) Mutaţia (alterarea codului genetic) poate duce la sinteza unei proteine diferite, cu proprietăţi catalitice reduse. De exemplu, substituirea unui singur aminoacid în centrul activ al enzimei poate duce la pierderea activităţii enzimatice. În alte cazuri, mutaţia poate afecta o zonă alosterică, enzima pierzîndu-şi capacitatea de a fi reglată de efectorii alosterici.

2) Mutaţia poate provoca modificări în structura enzimei care nu-i afectează funcţia catalitică dar îi conferă o stabilitate redusă, fiind rapid distrusă *in vivo*. O astfel de enzimă are o viaţă activă dar scurtă iar atunci cînd sinteza nu poate ţine pasul cu ritmul accelerat al degradării, apare deficitul enzimatic.

3) Mutaţia poate duce la o oprire completă a sintezei de enzimă.

Aceste modalităţi diferite de producere a deficitului enzimatic explică discordanţele între rezultatele obţinute prin urmărirea activităţii unei enzime şi prin detectarea imunologică a aceleiaşi enzime. Astfel, în cazul formării unei proteine inactive enzimatic dar cu caractere antigenice păstrate, această proteină va fixa anticorpii, deşi este lipsită de proprietăţi catalitice.

Efectele deficitului enzimatic se exercită fie prin acumularea în exces a substratului, fie prin lipsa produsului de reacţie, fie prin devierea căii metabolice spre formarea de alţi produşi:



Aşa, de exemplu, în deficitul de glucoză 6-fosfatază nu se eliberează glucoză (produs de reacţie B) din depozitele de glicogen (substrat A), ceea ce are drept urmare, pe de o parte, hipoglicemie şi suferinţa sistemului nervos central, iar pe de altă parte acumularea de glicogen în ficat.

Se consideră, de asemenea, că în deficitul de galactozo-1-fosfaturidiltransferază, acumularea de galactozo-1-fosfat (substratul enzimei) este responsabilă de fenomenele toxice hepatice, renale și cerebrale din galactozemie.

Un alt exemplu ilustrativ este reprezentat de deficitul unei enzime din glandele suprarenale, care hidroxilează inelul steroidic la carbonul 21. Carența acestei enzime face ca steroizi nehidroxilați în poziția 21 și acumulați în suprarenala hipertrofiată să treacă pe o altă cale metabolică formînd hormoni androgeni care sînt răspunzători de virilizarea patologică a bolnavelor.

Este important de știut că manifestările clinice consecutive unor anumite erori înnăscute de metabolism nu se manifestă decît în condiții particulare. Așa de exemplu, fenomenele de hemoliză survenind la subiecți cu anumite deficite enzimatice ale eritrocitelor (de exemplu, deficit de glucozo-6-fosfat dehidrogenază) sînt declanșate doar atunci cînd subiecții afectați sînt expuși la anumite toxice industriale sau ingerează medicamente de tipul primaquinei (1, 16).

Terapia erorilor înnăscute de metabolism este descurajantă iar încercările de a suplini deficitul enzimatic prin administrarea de enzime incluse în liposomi sînt încă în stadiul experimental. Totuși, depistarea precoce a anomaliei în unele cazuri de galactozemie sau fenilcetonurie și scoaterea din alimentație a substanțelor care nu pot fi metabolizate, respectiv galactoza sau fenilalanina, permite o dezvoltare relativ normală a subiectului afectat (19).

APENDIX

Cîteva informații practice privind recoltarea, transportul și conservarea probelor

Datele prezentate anterior au demonstrat valoarea diagnostică a determinărilor de enzime serice. Pentru ca aceste determinări să fie utile este însă necesar ca ele să fie corect executate. Nu insistăm asupra erorilor de laborator cauzate de utilizarea unor substrate neadecvate, a unor tampoane cu pH incorect sau de nerespectarea temperaturii optime. Detalii privind evitarea acestor surse de eroare sînt trecute în manualele cu tehnici de laborator sau în instrucțiunile privind modul de utilizare a reactivilor standardizați.

Ne vom opri însă asupra surselor de eroare care pot interveni în traseul dintre secțiile clinice și laboratoarele de biochimie clinică.

Hemoliza poate falsifica în mare măsură determinările de LDH, GOT și într-o măsură mai redusă determinările de GPT, CK, CHE, γGT și fosfatază acidă. Se știe că hemoliza este favorizată de staza venoasă prelungită, seringi ude, recoltarea cu spumă a sîngelui, traumatizarea sîngelui (expulsia sub presiune a sîngelui din seringă, agitarea viguroasă a eprubetei), precum și datorită intervalului prea lung de timp între recoltarea sîngelui și separarea serului. Este din acest motiv recomandabil ca atunci, cînd analiza nu se face în decurs de cîteva ore sau cînd probele se transportă la un alt laborator, să se procedeze cît mai curind la separarea serului (1).

Modul de conservare a serului pînă la efectuarea determinărilor de enzime este de asemenea important. Astfel în timp ce unele enzime ca α-amilaza, lipaza, γ-glutamiltransferaza, colinesteraza și aminopeptidaza pot fi păstrate atît la +4°C cît și la temperatura camerei fără a-și pierde activitatea catalitică pe timp de cel puțin șapte zile, fosfataza alcalină își

păstrează neafectată activitatea doar la +4°C, în timp ce la temperatura camerei activitatea scade cu aproximativ 3% după trei zile şi cu 10% după şapte zile (1).

GOT pierde din activitate doar 2—5% în primele două zile de conservare atît la +4°C cît şi la +25°C, în timp ce GPT este mai susceptibilă la inactivare, activitatea ei scăzînd în decursul a două zile cu 5% (la +4°C) şi cu 12% (la +25°C). După şapte zile însă, GOT scade cu 12% iar GPT cu 30%, indiferent de temperatura de conservare.

Scăderi importante ale activităţii CK survin în decurs de cîteva ore de la recoltare dar la adăugarea reactivilor conţinînd grupări SH (de exemplu N-acetilcisteină), enzima se reactivează. Conservarea de peste cinci zile la temperatura camerei duce la pierderi ale activităţii de aproximativ 20%, în timp ce la +4°C pierderea activităţii este minimă (2% după şapte zile).

Fostafaza acidă se inactivează extrem de rapid astfel incît analizarea ei ar trebui efectuată în decurs de 2 ore de la recoltare. Dacă însă serul este adus la un pH de 5,5—6, activitatea enzimei se păstrează nealterată pe timp de cel puţin şapte zile atît la +4°C cît şi la 25°C.

Deşi aşa cum s-a arătat, o serie de enzime se conservă bine şi la temperatura camerei, se recomandă ca serurile care nu se analizează în aceeaşi zi să fie păstrate la +4°C în eprubete cu dop pentru a se evita evaporarea.

O situaţie particulară este aceea a LDH care, în primele trei zile, se inactivează mai rapid la +4°C (8% pierdere) decît la +25°C (pierdere a activităţii de abia 2%.)

Enzimele coagulării (factorii VII, IX, X, XIII) precum şi LCAT se păstrează de preferinţă la —20°C, în timp ce reactivii conţinînd emulsii de enzime (de exemplu, reactivi pentru dozarea trigliceridelor) se pot inactiva prin îngheţare. Un fenomen interesant este aşa-zisa activare la rece a factorului VII al coagulării care, conservat la +4°C sau la 0°C, îşi creşte activitatea, fenomenul fiind însă prevenit la temperaturi sub —20°C.

BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

1. Adolph, L., Lorenz, R. *Enzyme diagnosis in diseases of the Heart, Liver and Pancreas*, S. Karger, Basel, München, Paris, London, New York, Sydney, 1982.
2. Annoni, G., Chirillo, R., Swannie, D., *Prognostic value of mitochondrial aspartate aminotransferaze in acute myocardial infarction*, Clinical Biochemistry, 1986, 19, 235.
3. Bedeleanu, D., Trif, I., Lötsch, I. C., Cucuianu, M. P., *Increased values of antipyrine clearance in type IV hyperlipoproteinemia*, Rev. Roum. Méd. Méd. Int., 1986, 24, 183—190.
4. Clitherow, J. W., Mitchard, M., Harper, W. I., *The possible biological function of pseudocholinesterase*, Nature, 1963, 199, 1000.
5. Cucuianu M., Hărăguş, Şt., Popescu, T. A., *Pseudocolinesteraza serică şi funcţia proteosintetică a ficatului*, Stud. Cerc. Med. Int. 1969, 10, 15—28.
6. Cucuianu, M., Bornuz, F., Macavei, I., *Effect of L-asparaginase therapy upon serum pseudocholinesterase and ceruloplasmin levels in patients with acute leukemia*, Clin. Chim. Acta., 1972, 38, 97.
7. Cucuianu, M., Deac, M., Bornuz, F., Macavei, I., *Effect of L-asparaginase therapy upon some indices of protein metabolism in leukemic patients*, Rev. Roum. Méd. Int., 1973, 10, 67.
8. Cucuianu, M., Zdrenghea, D., Pop, M., Opincaru, A., *Increased serum γ-glutamyltransferase in hypertriglyceridemia: comparison with serum pseudocholinesterase*, Clin. Chim. Acta., 1976, 71, 419.

9. Cucuianu, M., Opincaru, A., Tăpălagă, D., *Similar behaviour of lecithin : cholesterol acyltransferase and pseudocholinesterase in liver disease and hyperlipoproteinemia*, Clin. Chim. Acta., 1978, 85, 73.
10. Cucuianu, M., Vlaicu, R., Popescu, T. A., Hoinărescu, E., Pintea, L., Costin-Pușcaș, M., Pop, M., *Behaviour of γ-glutamyltransferase in chronic consumers of alcool*, Rev. Roum. Méd. Méd, Int., 1980, 18, 189.
11. Cucuianu, M., Dosan, L., Hoinărescu, E., Pintea, L., Fischer, S., *Comportarea lacticodehidrogenazei, colinesterazei și γ-glutamyltransferazei serice în sindromele anemice*, Clujul Medical, 1984, 57, 103.
12. Cucuianu, M., *Biochimia clinică a hemostazei*, Editura Dacia, 1983, 174—176.
13. Dubach, U. C., *Enzymes in urine and kidney*, Ed. H. Huber, Berne-Stuttgart, 1968.
14. Esmon, C. T., Sadowski, I. A., Suttie, J. W., *New carboxylation reaction vitamin K-dependent incorporation of H^{12} CO_3 into prothombin*, J. Biol. Chem., 1975, 250, 4744.
15. Farnier, M., Brun, J. M., Putelat, R., *Variations de la gamma-glutamyltranspeptidase dans les affections thyroidiennes*, Lyon Médical, 1982, 248, 105.
16. Goedde, H. W., Doenickes, A., Altland, K., *Pseudocholinesterasen (Pharmakogenetik, Biochemie. Klinik)*, Ed. Springer, Berlin-Heidelberg, New York, 1967.
17. Goldberg, D. M., *Structural, functional and clinical aspects of glutamyltransferase*, C.R.C. Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences, 1980, 12, 1—58.
18. Goldberg, D. M., *The expanding role of microsomal enzyme induction and ist implications for clinical chemistry*, Clinical Chemistry, 1980, 26, 691.
19. Hirris, H., *Theorie génétiques des erreurs innées du métabolisme*, Triangle, 1971, 10, 41.
20. Köttgen, E., *Die Gamma-Glutamyltransferase. Pathobiochemie und differentialdiagnostische Wertigkeit*, Internist, 1980, 21, 231.
21. Kühn, H. A., Wernze, H., *Klinische Hepatologie*, Ed. Thieme, Stuttgart, 1979.
22. La Due, J. S., Wroblewski, F., Karmen, A., *Serum glutamic oxalacetic transaminase activity in human acute transmural myocardial infarction*, Science, 1954, 120, 497.
23. Lamb, R. G., Fallon, H. G., *An enzymatic explanation for dietary induced alteration in hepatic glycerolipid metabolism*, Biochim. Biophys. Acta., 1974, 348, 179.
24. Lorand, L., *Haemorrhagic syndrome of autoimmune origin with a specific inhibitor against fibrin stabilizing factor (factor XIII)*, Br. J. Haematol., 1972, 23, 17.
25. Lorenz, K., *α—Amylase Erigenschaften, Analytik und Klinische Bedeutung Laboratoriumsblätter*, Behringwerke, 1982, 3, 117—128.
26. Luoma, P. V., Sotaniemi, E. A., Pelkonen, R. O., Pirttiaho, H. I., *Serum LDL and HDL colesterol an liver size in subjects in drugs inducing hepatic microsomal enzymes*, Eur. J. Clin. Pharmacol. 1985, 28, 615.
27. Martin, P. J., Martin, J. V., Goldberg, D. M., *γ-glutamyltranspeptidase, triglycerides and enzymes induction*, Brit. Med. J., 1975, 1, 17.
28. Mircea, P., Cucuianu, M., Mădărășan-Vulcan, G., Vlaicu, R., *Value of gamma-glutamyltransferase in the diagnosis of liver metastases*, Rev. Roum. Med. Med. Int., 1981, 19, 339.
29. Olsson, A. G., *Studies in asymptomatic primary hyperlipidemia II Clinical findings*, Acta. Med. Scand., 1975, 197, 477.
30. Pappo, A., Funduc, I., Rădulesco, M., Zamfiresco-Gheorghiu, M., *Recherches sur le valeur de la gamma-glutamyltranspeptidase dans le diagnostic des affections hépato-biliaires*, Rev. Roum. Med. Med. Int., 1970, 7, 25.
31. Pfaff, G., Beyer, A., *Maligne Hyperthermie*, Annaestesiologie und Intensivmedizin, 1981 22, 67—74.
32. Rasmussen, H., *The clacium messenger system*, New Engl. J. Med., 1986, 314, I, 1094—1001; II. 1164—1170.

33. Rentrop, P., *Thrombolytic therapy in patients with acute myocardial infarction*, Circulation, 1985, 71, 627.
34. Richterich, R., *Enzymopathologie*, Ed. Springer, Berlin, Göttingen, Heidelberg, 1958.
35. Rodwell, V., *Enzymes* in H. A., Harper, *Review of Physiological Chemistry* ed. 14, Lange Med. Bubl., Los Altos, California, 1973.
36. Schmidt, E., Schmidt, F. W., *Enzym-Fibel 5-Nachdruck*, Boehringer Mannheim GmbH, 1971.
37. Schmidt, E., Schmidt, F. W., *Klinische Pathophysiologie*, 3rd ed. Thieme, Stuttgart, 1975.
38. Simon, S. O., Kim, H. C., Wu, H. V., Saidi, P., *Serum lactic dehydrogenase activity in refractory megaloblastic anemia*, Blood, 1978, 52. suppl. 1. abstr. 48, 90.
39. Skrede, S., Blomhoff, J. P., Elgjo, K., Gjone, E., *Biochemical tests in evaluation of liver functions*, Scand. J. Gastroenterol., 1973, 8, suppl. 19, 37.
40. Skrede, S., Blomhoff, J. P., Gjone, E., *Biochemical features of acute and chronic hepatitis*, Annals of Clinical Research, 1976, 8, 182–199.
41. Tajiri, I., Nishizono Y., Fujiyama, S., Sagara, K., Sato, T., Shibata, H., *Hypercholinesterasemia in patients with hepatocellular carcinoma : a new paraneoplastic syndrome*, Gastroenterologia japonica, 1983, 18, 137.
42. Tăpălagă, D., Opincaru, A., Cucuianu, M., *Hepatic secretion enzymes and electrophoretic lipoprotein fractions in liver disease*, Acta Hepato-gastroenterologica, 1979, 26, 9.
43. Thompson, J. C., Whittaker, M., *Pseudocholinesterase activity in thyroid disease*, J. Clin. Path., 1965, 18, 811.
44. Vermylen, I., Blockmans, D., Spitz, B., Deckmyn, H., *Thrombosis and Immune Disorders*, Clinics in Haematology, 1986, 15, 393–412.
45. Vlaicu, R., Zdrenghea, D., Iacob, P., Cucuianu, M., *Comportarea ceruloplasminei, pseudocolinesterazei serice şi gama-glutamiltransferazei în ficatul de stază*, Med. Int. (Buc.), 1977, 29, 121.
46. Vlaicu, R., Popescu, E., Popescu, T. A., Cucuianu, M., *Serumelectrophoretic lipoprotein fractions and pseudocholinesterase activity in thyroid disease*, Rev. Roum. Méd. Endocrinol., 1978, 16, 147.
47. Vlaicu, R., Olinic, N., *Reabilitarea precoce a bolnavilor de infarct miocardic*, Ed. Dacia, Cluj-Napoca, 1983.
48. Wewalka, F., *Enzyme bei Knochenerkrankungen und Cholestase*, în H. Aebi, H, Mattenheimer, F. W. Schmidt (Editors), *Praktische Enzymologie*, Ed. Hans Huber, Bern-Stuttgart, 1968, 319–354.
49. Wintrobe, M. M., *Clinical Hematology*, Ed. Lee and Febiger, Philadelphia, 1974.

IV. EXPLORAREA BIOCHIMICĂ A FICATULUI

Extrem de numeroasele teste de explorare biochimică utilizate în bolile ficatului au valoare diagnostică doar dacă sînt bine fundamentate din punct de vedere fiziopatologic și doar atunci cînd sînt interpretate în lumina datelor clinice. În astfel de condiții, aceste investigații sînt utile pentru:

a) Diagnosticul pozitiv și diferențial al icterelor și în general al diverselor boli hepatice;

b) Aprecierea gravității unei suferințe hepatice și implicit stabilirea prognosticului;

c) Evaluarea eficacității terapiei.

Alături de informațiile menționate se întrevede astăzi posibilitatea unei clasificări pe baze biochimice a bolilor ficatului urmînd ca astfel de încercări să fie confruntate cu clasificările bazate pe datele de morfologie.

Este de dorit ca orice probă de explorare să fie *cît mai specifică* pentru procesele patologice care afectează ficatul, pozitivîndu-se doar în boli hepatice și totodată să fie *cît mai sensibilă* furnizînd informații precoce și decelînd astfel leziuni minime sau incipiente. Este, de asemenea, important ca astfel de explorări să fie ușor de suportat pentru bolnav, să nu implice dificultăți tehnice pentru laborator și totodată să nu necesite cheltuieli excesive.

Observația clinică a semnalat de multă vreme existența unor așa-zise dissinergisme și asincronisme ale probelor funcționale hepatice care nu se pozitivează în aceeași măsură și, respectiv, în același timp. Aceasta se datorește mai ales faptului că diversele probe de laborator reflectă procese patologice și mecanisme patogenice diferite. Din punct de vedere didactic și în funcție de procesul patologic pe care îl decelează, probele biochimice de explorare a ficatului pot fi clasificate pe următoarele categorii:

1) Probe de laborator, care semnalează existența unui proces inflamator cronic în mezenchimul hepatic și care corespunde pe plan morfologic unei infiltrații limfoplasmocitare în spațiile interstițiale ale lui Kiernan.

2) Teste biochimice, care indică existența unor leziuni ale hepatocitelor care duc la creșterea permeabilității membranei acestor celule.

3) Investigații de laborator care reflectă o insuficiență funcțională a ficatului.

4) Probe care denotă un proces colestatic.

Ca şi în cazul oricărei tentative de clasificare, cea prezentată are un caracter relativ. Aşa de exemplu, un proces inflamator poate duce atît la o infiltraţie limfoplasmocitară cît şi la creşteri ale permeabilităţii membranei hepatocitelor. De asemenea, o creştere a acizilor biliari în ser poate fi atît o consecinţă a colestazei cît şi a unei insuficienţe a hepatocitului în procesul de captare şi eliminare prin bilă a acestor compuşi. Pe de altă parte, o colestază prelungită afectează cu timpul capacitatea funcţională a celulelor hepatice.

Nu este însă mai puţin adevărat că urmărirea dinamică a comportării diverselor categorii de probe hepatice menţionate şi interpretarea rezultatelor obţinute în lumina datelor clinice sînt, de regulă, în măsură să prezinte o imagine destul de apropiată de realitate a fenomenelor care se petrec într-o boală care afectează ficatul.

Sarcina de a prezenta în acest capitol principiile care stau la baza explorării prin teste de laborator a ficatului este cel puţin în parte uşurată prin faptul că o bună parte a mecanismelor biochimice care duc la modificările proteinelor şi enzimelor serice în bolile hepatice a fost prezentată în capitolele precedente.

IV.1. TESTE CARE REFLECTĂ O INFLAMAŢIE CRONICĂ ÎN INTERSTIŢIUL FICATULUI

Infiltraţiile limfoplasmocitare în spaţiile lui Kiernan şi, în general, existenţa unor procese reactive de tip imun în splină sau măduva osoasă; care însoţesc o afecţiune hepatică cronică, se trădează prin creşterea imunoglobulinelor serice. Creşterea amintită interesează de regulă mai multe clase de imunoglobuline realizînd o aşa-zisă *hiperimunoglobulinemie policlonală* (vezi pag. 148). Se pare că gradul de creştere al imunoglobulinelor este într-o oarecare măsură paralel cu extensia şi tendinţa la progresiune a procesului inflamator. Aşa de exemplu, într-o hepatită cronică persistentă, în care procesul inflamator este aproape în întregime limitat la spaţiile portale, creşterea imunoglobulinelor este moderată (în medie IgG 1600 mg/dl, IgA 320 mg/dl, IgM 170 mg/dl), pe cînd într-o hepatită cronică progresivă, în care infiltraţia limfoplasmocitară se extinde din spaţiile portale spre şi între cordoanele de hepatocite realizînd un aspect agresiv, hipergamaglobulinemia este mult mai accentuată (în medie IgG 2600 mg/dl; IgA 340 mg/dl, IgM 280 mg/dl).

În hepatita acută, creşterea imunoglobulinelor este variabilă în funcţie de durata bolii şi de răspunsul individual la infecţia virală. De regulă, astfel de creşteri nu sînt atît de accentuate ca într-o hepatită cronică progresivă şi se caracterizează mai ales printr-un nivel ridicat de IgM (în medie 540 mg/dl).

Există indicii după care în hepatita cronică ar creşte mai ales IgG, în cirozele biliare creşterea IgM s-ar situa pe primul plan iar în ciroza alcoolică s-ar semnala o creştere a concentraţiei de IgA (19).

Alte teste imunologice, cum ar fi prezenţa de anticorpi antitisulari, sînt adeseori pozitive în hepatite. De exemplu, anticorpii antimuşchi ne-

ted s-ar detecta mai ales în hepatitele cronice progresive iar anticorpii antimitocondriali ar surveni cu mai mare frecvență în cirozele biliare.

Valoarea unor astfel de teste imunologice în stabilirea unui diagnostic diferențial al suferințelor hepatice este însă redusă și la ora actuală nu se poate încă vorbi de aspecte imunologice tipice pentru vreo boală a ficatului. De altfel, hipergamaglobulinemia policlonală nu este specifică pentru hepatopatii. Așa cum s-a mai arătat (vezi pag. 148), orice proces inflamator cronic (de exemplu, o poliartrită cronică evolutivă, o endocardită infecțioasă, sau un proces tuberculos) poate evolua cu o disproteinemie de acest tip.

Reacția de fază acută, mediată probabil de un răspuns hormonal, poate surveni într-o boală hepatică cu caracter inflamator, dar nivelul plasmatic al proteinelor de fază acută (vezi pag. 151) este influențat de măsura în care o eventuală insuficiență a hepatocitelor afectează sinteza diverselor proteine. De fapt, hepatita acută virală nu evoluează cu nivele crescute ale α globulinelor, iar concentrația haptoglobinelor scade.

O creștere a α_1 și α_2 globulinelor se poate totuși întîlni în bolile hepatice, evoluînd cu fenomene accentuate de colestază, precum și în procesele tumorale primare sau secundare ale ficatului.

Comportarea proteinelor sistemului complement (vezi pag. 127) în bolile hepatice este, de asemenea, dependentă nu numai de reacția inflamatorie, dar și de consumul unor componente în procesul imunologic și mai ales de capacitatea de sinteză a lor la nivelul ficatului. Așa de exemplu, scăderea componentei C_3 în hepatite s-a dovedit a fi mai degrabă o consecință a unui deficit de sinteză decît a unui consum accelerat (19).

Posibilitățile oferite laboratoarelor clinice de a doza proteinele plasmatice prin metode electroforetice și imunochimice au făcut ca așa-zisele *teste de disproteinemie sau de labilitate coloidală* să apară desuete sau în orice caz depășite. În realitate, astfel de teste nu sînt total lipsite de interes, avînd chiar un anumit grad de utilitate practică. De fapt, chiar dacă orice laborator de analize ar avea posibilitatea de a efectua determinări electroforetice și imunochimice (ceea ce nu este cazul), testele de labilitate coloidală prezintă avantajul de a furniza rezultate în decurs de 15—30 minute.

Testul cu timol este mai puțin bine fundamentat biochimic și se pozitivează în caz de creștere a unor globuline cu migrare β și γ precum și a unor lipoproteine care reduc stabilitatea coloidală a serului. Pe de altă parte, testul cu sulfat de zinc furnizează relații rapide și destul de fidele cu privire la creșterea γ globulinelor serice. Este important de arătat că în multe cazuri de ciroză avansată, testul timol este normal, în timp ce testul cu sulfat de zinc este în mod evident alterat.

IV.2. TESTE CARE INDICĂ O CREȘTERE A PERMEABILITĂȚII MEMBRANEI HEPATOCITELOR

Mecanismele care duc la creșterea în ser a enzimelor provenite din hepatocite indicînd permeabilizarea membranelor celulare au fost prezentate pe larg în capitolul precedent (vezi pag. 194 și pag. 215). Practica

clinică a dovedit că, în marea majoritate a cazurilor, determinarea aminotransferazelor este suficientă pentru detectarea unui astfel de proces, iar dozările unor enzime „mai specifice" pentru ficat, așa cum sînt ornitincabamiltransferaza sau guanaza, trebuie limitate doar pentru stările patologice în care se bănuiește existența unor leziuni care afectează mai multe organe, astfel încît sursa creșterii în ser a aminotransferazelor este neclară.

Gradul de creștere a aminotransferazelor și raportul dintre aspartataminotransferază (AST, GOT), și alaninaminotransferază (ALT, GPT) diferă în funcție de forma clinică a bolii hepatice. Așa de exemplu, în hepatita acută virală, aminotransferazele depășesc de 10—100 ori limita superioară a normalului (în medie de 50 de ori) iar, de regulă, GPT > GOT.

În hepatita cronică progresivă, aminotransferazele cresc cel mult de 20 ori limita superioară a normalului (valori între 5—20 X) iar în puseele necrotice GOT > GPT.

Nivelul seric al aminotransferazelor este mai puțin crescut (3—4 X) în hepatitele cronice persistente în care, așa cum s-a arătat, infiltratul inflamator este cantonat doar în spațiile portale.

Leziunile toxice acute ale ficatului (ciuperci, Cl_4C) evoluînd cu necroze celulare se însoțesc de creșteri deosebit de intense și de rapide ale enzimelor celulare (de peste 100 X limita superioară) iar GOT > GPT. În astfel de condiții, creșteri importante se constată chiar și în cazul izoenzimelor LDH_4, LDH_5, caracterizate printr-o mare viteză de îndepărtare din plasmă (vezi pag. 197).

Hepatopatia alcoolică acută duce la majorări relativ importante ale aminotransferazelor (de 5—10 X limita superioară a normalului) iar GOT > GPT.

În cirozele biliare primitive, creșterile aminotransferazelor sînt moderate (2—3 X limita superioară a normalului), iar în cirozele alcoolice sau postnecrotice, consecutive unor hepatite virale, modificările serice ale enzimelor celulare sînt și mai puțin exprimate (vezi pag. 218).

IV.3. TESTE CARE INDICĂ O INSUFICIENȚĂ FUNCȚIONALĂ A FICATULUI

Ficatul intervine în numeroase procese metabolice, sintetizează o bună parte a proteinelor plasmatice și joacă un rol esențial în procesul de detoxifiere și îndepărtare din organism a xenobioticelor. Îndeplinirea acestor funcții depinde nu numai de capacitatea funcțională a fiecărei celule hepatice și de masa de celule hepatice funcționale dar și de integritatea circulației hepatice și respectiv de perfuzia celulelor hepatice. Este evident că o alterare a circulației hepatice și în special un proces de scurtcircuitare portosistemică afectează în special testele de traversare hepatică a coloranților și de detoxificare a produșilor proveniți din putrefacția intestinală, chiar dacă masa de celule hepatice nu este excesiv de redusă iar funcția proteosintetică a ficatului este parțial menținută. Din acest motiv, apare necesară o diferențiere în mai multe categorii a testelor funcționale hepatice.

Valoarea și limitele unor astfel de teste au fost pe larg discutate în capitolul precedent în legătură cu comportarea colinesterazei serice (vezi pag. 219).

De notat că anomaliile coagulării și fibrinolizei și respectiv apariția unui sindrom hemoragic într-o hepatopatie severă se explică, cel puțin în parte, prin scăderea capacității ficatului de a sintetiza diversele proteine cu rol în hemostază (4, 8).

Așa cum s-a arătat, testele care indică scăderea prealbuminei și a factorilor coagulării dependenți de vitamina K (mai ales a factorului VII) sînt utile în special pentru detectarea unei insuficiențe hepatice rapid instalate, în timp ce activitatea colinesterazei serice și nivelul albuminei serice scad mai ales în insuficiențele hepatice care se dezvoltă lent și progresiv în evoluția unor ciroze hepatice.

Reamintim valoarea prognostică a determinărilor seriate de colinesterază serică (vezi fig. 3.24) precum și faptul că activitatea acestei enzime poate scădea în mod trecător în cursul unei reacții de fază acută, în cursul terapiei cu ciclofosfamidă sau că poate prezenta un nivel scăzut datorită unui deficit genetic.

O situație oarecum particulară a sintezelor hepatice de proteine survine în cursul hepatopatiilor colestatice. Se pare că retenția biliară stimulează sinteza unor proteine, ca de exemplu factorii coagulării dependenți de vitamina K (factorii II, VII, IX, X) componenta C_3 a complementului, proteina C reactivă și o serie de inhibitori ai proteazelor (7).

Această stimulare a sintezei de proteine nu afectează însă colinesteraza serică al cărei nivel scade și în cursul hepatopatiilor colestatice și mai ales în ciroza biliară.

Este evident că în cazul unei colestaze extrahepatice care perturbă absorbția vitaminei K, activitatea factorilor coagulării, dependenți de această vitamină, scade. Scăderea menționată a activității procoagulante nu se datorește însă lipsei de sinteză ci faptului că în absența vitaminei K se sintetizează molecule incomplete ale respectivilor factori care sînt lipsite de radicali γ-carboxiglutamici. Ca urmare, aceste molecule incomplete care apar și în cursul terapiei cu antagoniști ai vitaminei K (dicumarol, warfarină) nu pot fixa ionii de calciu prin intermediul cărora formează complexe cu fosfolipidele și cu diverși cofactori ai coagulării (factor V, factor VIII) și nu devin eficiente în procesul de activare în cascadă a coagulării. Astfel de molecule incomplete de protrombină, cunoscute sub denumirea de PIVKA (proteină indusă în absența sau antagonizarea vitaminei K), pot fi detectate pe cale imunologică, deși sînt inactive în procesul de coagulare. Administrarea parenterală de vitamina K restabilește însă prompt activitatea procoagulantă a plasmei în astfel de cazuri.

Spre deosebire de situațiile menționate, *în insuficiența hepatică, scăderea proteazelor serinice dependente de vitamina K este reală și se datorește scăderii capacității de sinteză*, iar administrarea vitaminei K nu restabilește activitatea procoagulantă (8).

Deficitul de sinteză hepatică afectează și producția de *fibronectină*, de *factor XIII stabilizator al fibrinei* și de *inhibitori ai fibrinolizei* și în special de α_2 inhibitor al plasminei (vezi pag. 102). La acest deficit se adaugă și o reducere a capacității ficatului de a capta și inactiva activatorii plasminogenului produși de către endoteliile vasculare. Ca urmare, cheagurile hemostatice, produse în organismul unui bolnav cu ciroză hepatică decompensată parenchimatoasă, sînt mai fragile și mai susceptibile la dezintegrarea prin fibrinoliză.

Deşi hemoragiile care survin la aproximativ 15—25% din subiecţii cu ciroză hepatică se datoresc, în primul rînd, unor factori locali (varice esofagiene, ulceraţii pe tractul digestiv, hemoroizi), dezechilibrul între incetinirea coagulării şi accelerarea fibrinolizei contribuie în mare măsură la imprimarea unei note de severitate a acestor hemoragii precum şi la tendinţa lor de a se repeta sau de a se prelungi (4, 8).

Perturbarea hemostazei în insuficienţa hepatică, evoluînd cu deficit de sinteză a factorilor coagulării, prezintă aspecte şi mai complexe dacă se ia în considerare faptul că, în astfel de condiţii, se reduce şi sinteza antitrombinei III, principalul factor inhibitor al coagulării, precum şi a proteinei C cu rol de inactivare a factorilor V şi VIII activaţi în cursul coagulării. Ţinînd seama că ficatul participă şi la captarea şi inactivarea unor factori activaţi ai coagulării, există premisele explicării fenomenelor de coagulare intravasculară diseminată constatate în unele cazuri de insuficienţă hepatică acută (8). Astfel de cazuri se însoţesc de creşterea produşilor de degradare a fibrinei şi de scăderea fibrinogenemiei şi a numărului de plăcuţe sanguine. Menţionăm cu acest prilej că, deşi fibrinogenul este produs în ficat, nivelul fibrinogenemiei scade doar rareori în bolile hepatice, inclusiv în cirozele hepatice decompensate parenchimatos.

IV.3.2. TESTE CARE EXPLOREAZĂ CAPACITATEA METABOLICĂ A FICATULUI

Viteza cu care ficatul captează şi elimină din plasmă anumite substanţe poate constitui o măsură a capacităţii funcţionale a acestui organ. Astfel de substanţe pot fi metaboliţi fiziologici, ca de exemplu galactoza şi diverşi acizi aminaţi, sau substanţe străine organismului (xenobiotice) cum sînt unii coloranţi sau diverse medicamente care se metabolizează în ficat (5, 20).

Pentru ca un xenobiotic să poată fi utilizat în clinică, el trebuie să îndeplinească anumite condiţii: să nu fie toxic pentru un bolnav hepatic; să fie eliminat din plasmă doar, sau mai ales prin captare hepatică; să poată fi administrat pe cale intravenoasă sau, în caz de administrare pe cale orală, să se adsoarbă rapid şi cît mai complet; să poată fi dozat în plasmă sau eventual în salivă.

Prin dozări seriate din plasmă ale substanţei administrate se poate obţine o măsură a vitezei sale de eliminare.

Pentru majoritatea acestor substanţe eliminarea lor din plasmă decurge logaritmic. Cu alte cuvinte, prin raportarea logaritmilor concentraţiilor în plasmă la timp se obţine o linie dreaptă (vezi fig. 3.17 la pag. 192). Pe baza determinării timpului de înjumătăţire în plasmă a substanţei (t 1/2), se poate calcula ulterior valoarea clearance (Cl) conform formulei $Cl = \frac{0{,}693 \times Vd}{t\,1/2}$ unde 0,693 reprezintă logaritmul natural de 2, iar *Vd* reprezintă volumul de distribuţie al substanţei. La rîndul său *Vd* se calculează împărţind doza de substanţă administrată la concentraţia plasmatică a respectivei substanţe extrapolată la timpul 0.

Este important de a preciza că valorile clearance depind nu numai de capacitatea de captare şi de metabolizare de către hepatocite a substanţelor administrate dar şi de debitul sanguin hepatic. Dependenţa faţă de fluxul sanguin este deosebit de accentuată în cazul substanţelor caracterizate printr-un raport de extracţie hepatică ridicat, res-

pectiv în cazul unei diferențe exprimate între concentrația substanței în sîngele care intră în ficat și cel care iese din ficat prin venele suprahepatice. Din acest motiv, într-un caz de insuficiență cardiacă, explorarea ficatului cu bromsulfonftaleină (BSP) furnizează valori de clearance mult mai alterate decît s-ar putea explica prin suferința hepatică (20).

Spre deosebire de situația relatată, în cazul administrării de antipirină, care prezintă un raport de extracție mult mai redus, variațiile fluxului sanguin exercită un efect minor asupra procesului de clearance, care reflectă astfel mai fidel funcția hepatocitelor.

În cele ce urmează sînt prezentate cîteva procedee de explorare a capacității metabolice și de excreție a ficatului.

Excreția de bromsulfonftaleină (BSP). Acest colorant, administrat intravenos într-o doză de 5 mg/kg greutate corporală, se fixează pe proteinele plasmatice și, ajuns la nivelul capilarelor sinusoide, este rapid captat de către hepatocite, conjugat cu acid glicuronic și eliminat prin bilă. Pe lîngă marea dependență a testului de fluxul sanguin hepatic, eliminările de BSP sînt influențate și de alți factori. Astfel substanțele care afectează funcția excretorie a ficatului, cum sînt estrogenii sau steroizii anabolici, sau care se elimină din organism pe aceeași cale hepatică, ca de exemplu bilirubina sau agenții de contrast utilizați în colecistografie, reduc excreția de BSP. Pe de altă parte, agenții inductori, cum sînt barbituricele (vezi pag. 190), accelerează eliminările de BSP.

Cu rezervele amintite, testul cu BSP furnizează totuși relații privind capacitatea de depurare a ficatului astfel încît, în bolile hepatice, se constată o retenție a colorantului iar aproximativ 20% din doza de BSP se elimină prin urină.

În practică se utilizează fie determinarea procesului de clearance după formula amintită anterior, fie, mai simplu, gradul de retenție calculat din raportul între concentrația de BSP în ser la 3 minute de la injectarea preparatului și cea găsită după 45 de minute. În mod normal, peste 95% din colorant se elimină, respectiv 5% se reține în plasmă după 45 minute. Retenții de peste 10% se consideră ca fiind patologice. În ultima vreme, există însă tendința de a se renunța la testul cu BSP din cauza posibilității de apariție a unor efecte adverse cum ar fi tromboflebite și iritații accentuate după injecția intravenoasă, reacții alergice, mergînd pînă la șoc, și chiar fenomene de coagulare intravasculară diseminată (5).

Testul de clearance cu verde de indocianină. Acest colorant care se fixează și el pe proteinele plasmatice eliminîndu-se prin bilă sub formă neconjugată este, în genere, mai bine tolerat, dar, ca și testul cu BSP, depinde în mare măsură de fluxul sanguin hepatic (5, 20).

Testul cu antipirină. Medicamentul nu se fixează pe proteinele plasmatice și difuzează în toate compartimentele organismului (plasmă, lichid interstițial și apă celulară) putînd fi astfel utilizat pentru determinarea apei totale. El este captat de către hepatocite, metabolizat și eliminat din organism sub formă de metaboliți (3-hidroximetilantipirină, norantipirină, 4-hidroxiantipirină și p-hidroximetilantipirină). Toți acești patru metaboliți pot fi detectați în urină sub formă conjugată. Pentru explorarea ficatului sînt importante următoarele caracteristici ale antipirinei:

a) Medicamentul dat în soluție apoasă se absoarbe integral din intestin, ceea ce permite administrarea lui pe cale orală;

b) Antipirina se răspîndește relativ uniform în toate țesuturile și secrețiile, ceea ce permite dozarea ei nu numai în plasmă dar și în salivă.

c) Captarea și metabolizarea antipirinei de către hepatocite sînt doar în mică măsură influențate de variațiile debitului sanguin hepatic și deci reflectă mai fidel capacitatea metabolică a ficatului.

d) Dispariția din plasmă (sau salivă) decurge liniar atunci cînd logaritmii concentrațiilor se raportează la timp (vezi fig. 3.17 la pag. 192).

Există însă și anumite limite ale aplicării acestui test. S-a constatat astfel o variabilitate relativ mare a valorilor de clearance al antipirinei la subiecții sănătoși sau, în orice caz, fără boli hepatice, metabolizarea medicamentului fiind influențată de factori genetici, de volumul ficatului, de vîrstă (scade cu vîrsta), de starea de nutriție (scade la denutriți), precum și de eventualele medicații administrate. Așa de exemplu, agenții inductori (fenobarbital, DDT, dicumarol) accelerează ritmul de metabolizare al antipirinei iar betablocantele, de tipul propranololului, încetinesc procesul de clearance.

Este, de asemenea, important de știut că atît consumul cronic de alcool cît și fumatul tind să accelereze metabolizarea medicamentului (20). Bineînțeles că o dată cu instalarea cirozei alcoolice procesul de clearance al antipirinei diminuă.

Cu toate rezervele amintite, testul cu antipirină s-a dovedit util pentru detectarea insuficienței hepatice. Conform observațiilor efectuate în laboratorul nostru (vezi fig. 4.1), valoarea medie a procesului de clearance determinat la 10 bolnavi cu ciroză hepatică decompensată a fost de 21,88 ml/min, fiind semnificativ ($p < 0.001$) mai scăzută decît valoarea medie a subiecților sănătoși (41,64 ml/min). S-a constatat totodată o corelație semnificativă între valorile de clearance și activitatea colinesterazei serice (vezi fig. 4.2).

În practică, administrarea antipirinei se poate face intravenos (500 mg dizolvate în 10 ml soluție apoasă ușor hipotonică) recoltîndu-se apoi probe de sînge la 3, 5, 8, 28 și 32 ore de la injectare, pentru dozarea antipirinei în plasmă.

Rezultate reproductibile și bine corelate cu cele obținute prin

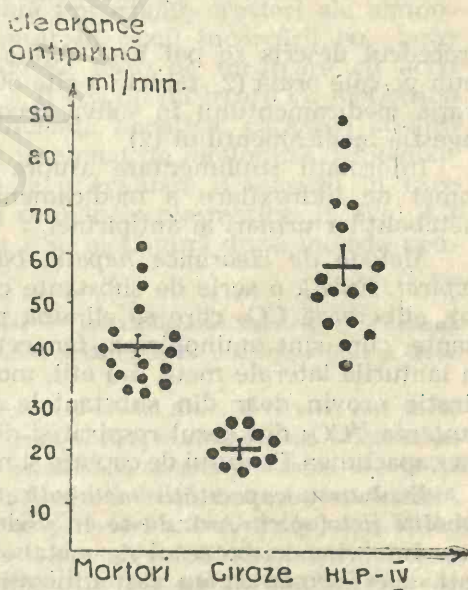


Fig. 4.1. Dispersia valorilor de clearance al antipirinei la subiecții sănătoși normolipemici și normoponderali (Martori), la bolnavi cu ciroză hepatică decompensată (ciroză) și la subiecții cu hiperlipoproteinemie tip IV. Pe ordonată: clearance antipirină în ml/min. Liniile orizontale întretăiate de bare verticale indică valorile medii ± eroarea standard a mediei.

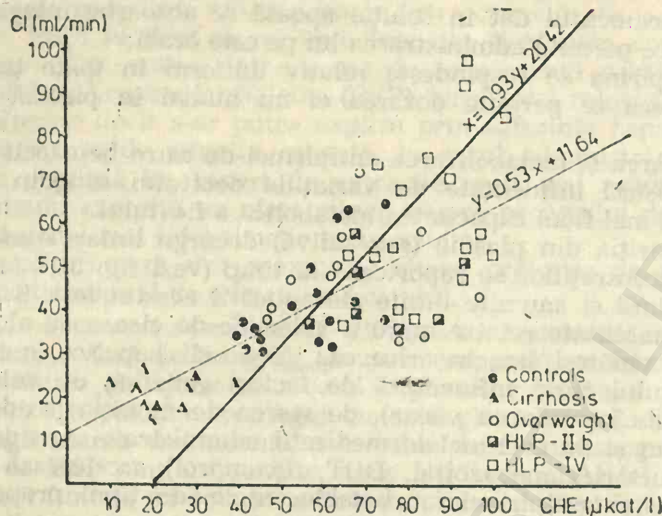


Fig. 4.2. Corelaţia statistică semnificativă ($r = 705$; $p < 0.001$) între activitatea colinesterazei serice (CHE) în µkat/l şi valorile de clearance antipirinic în ml/min. Bolnavii cu ciroză hepatică prezintă o scădere concomitentă a activităţii CHE şi a procesului de clearance al antipirinei.

procedeul descris se pot însă obţine şi prin administrarea antipirinei à jeun pe cale orală (2 tablete a cîte 500 mg) determinîndu-se apoi concentraţia medicamentului în saliva recoltată la 2, 4, 6, 10 şi 24 ore de la ingestia medicamentului (2).

Informaţii suplimentare asupra particularităţilor sistemului microsomal de hidroxilare a medicamentelor pot fi obţinute prin dozarea metaboliţilor urinari ai antipirinei.

Metode de clearance hepatic bazate pe dozarea de $^{14}CO_2$ în aerul expirat. Există o serie de substanţe care, în urma metabolizării lor în ficat, eliberează CO_2 care se elimină prin respiraţie. Dacă astfel de substanţe, cum sînt aminopirina, fenacetina sau cofeina sînt marcate cu ^{14}C în lanţurile laterale metil sau etil, moleculele de $^{14}CO_2$ eliminate prin respiraţie provin doar din substanţele marcate metabolizate în ficat. Prin captarea $^{14}CO_2$ din aerul respirat şi dozarea radioactivităţii se poate aprecia capacitatea ficatului de captare şi metabolizare a compuşilor amintiţi (5).

Evaluarea capacităţii metabolice a ficatului prin încărcarea cu metaboliţi fiziologici. Avîndu-se în vedere că ficatul este principalul organ care intervine în procesul de metabolizare a galactozei şi a acizilor aminaţi, aceşti compuşi au fost utilizaţi în diverse probe hepatice funcţionale.

Testul de galactoză se bazează pe faptul că la normali, acest monozaharid este rapid captat din plasmă doar la nivelul ficatului şi transformat în glucoză prin fosforilare şi epimerizare. Marea viteză de extracţie din plasmă a galactozei face ca acest test să fie în mare măsură dependent de variaţiile fluxului sanguin hepatic. Testul poate fi efectuat fie prin evaluarea scăderii concentraţiei plasmatice a galactozei, fie prin de-

terminarea galactozei, care, nefiind captată de ficat, se elimină prin urină. În această ultimă eventualitate (testul galactozuriei provocate), se administrează subiectului 40 g galactoză în 250 ml ceai, recoltîndu-se apoi urina pe timp de 4 ore. La subiecţii normali nu se elimină mai mult de 3 g galactoză în intervalul de timp amintit, pe cînd la hepatici, eliminările urinare cresc oarecum paralel cu gravitatea decompensării parenchimatoase. De notat însă că o scădere a debitului urinar poate duce la rezultate fals negative (eliminări reduse de galactoză), pe cînd la hipertiroidieni, diabetici sau la bolnavii trataţi cu glucocorticoizi se constată adeseori eliminări crescute.

În cazul administrării intravenoase 0,5 g/kg greutate corporală se urmăreşte scăderea concentraţiei galactozei în plasmă determinîndu-se t 1/2 şi valoarea clearance. În astfel de condiţii, se obţin relaţii mai ales cu privire la debitul circulator hepatic (5, 20).

Încărcarea cu acizi aminaţi. Ficatul reprezintă principalul organ în care are loc metabolizarea acizilor aminaţi. Mecanismele implicate în acest proces includ dezaminarea oxidativă, aminotransferarea (transaminarea) şi încorporarea acizilor aminaţi în proteinele hepatice sau în proteinele plasmatice de export. În condiţii normale, îndepărtarea aminoacizilor din sînge decurge cu o viteză maximală remarcabilă de peste 20 g/oră, captarea hepatică fiind favorizată de insulină. În insuficienţa hepatică severă sau în cursul terapiei cu L-asparaginază, care perturbă sintezele de proteine în ficat, se constată importante creşteri ale aminoacidemiei, fenomenul accentuîndu-se mult în cazul încărcării cu acizi aminaţi în perfuzie. S-au încercat diverse teste de încărcare cu acizi aminaţi dintre care mai sensibilă pare a fi cea de încărcare cu metionină marcată ^{35}S sau ^{75}Se. În caz de insuficienţă hepatică, captarea acestui aminoacid este încetinită şi un procent însemnat de metionină nemetabolizată apare în urină. Testul permite şi o evaluare a măsurii în care aminoacidul marcat se încorporează în proteinele plasmatice. În fig. 4.3 este reprodusă o probă de încărcare cu ^{75}Se metionină după metoda propusă de Szantay şi colab. (21).

Amonemia. Amoniacul (NH_3) este un produs de metabolism al bacteriilor intestinale şi, intr-o măsură mult mai redusă, un rezultat al dezaminării acizilor aminaţi în ficat şi în ţesuturile extrahepatice.

Cea mai mare parte a amoniacului se transformă la nivelul ficatului în uree, care se elimină prin urină şi doar mici cantităţi de amoniac scapă ca atare în aerul expirat. Graţie deosebitei eficienţe a procesului de ureogeneză, nivelul amoniacului sanguin se menţine la subiecţii normali în limite joase de 10—20 µg/dl (5,87—11,74 µmol/l). În caz de insuficienţă hepatică, survenită la un cirotic, şi mai ales în caz de şuntare porto-cavă a circulaţiei hepatice, nivelul amonemiei creşte pînă la de 5 ori limita superioară a normalului. Nivelul amonemiei creşte şi mai mult atunci cînd, la un bolnav cu ciroză hepatică, survine o hemoragie digestivă superioară. În comparaţie cu alte teste, determinarea amoniacului sanguin are însă o valoare mult mai limitată în ceea ce priveşte evaluarea rezervelor funcţionale ale ficatului. Creşterea amonemiei orientează totuşi asupra pericolului encefalopatiei portale, considerîndu-se că amoniacul ar avea un efect toxic asupra sistemului nervos central (6, 18). De fapt, amoniacul nu este singurul şi poate nici principalul compus toxic de provenienţă intestinală cu rol în producerea manifestărilor neuropsihice la bolnavii cu ciroză hepatică. Se ştie astăzi că sub acţiunea florei microbiene intestinale se produc o serie de amine rezultate din decarboxilarea acizilor aminaţi.

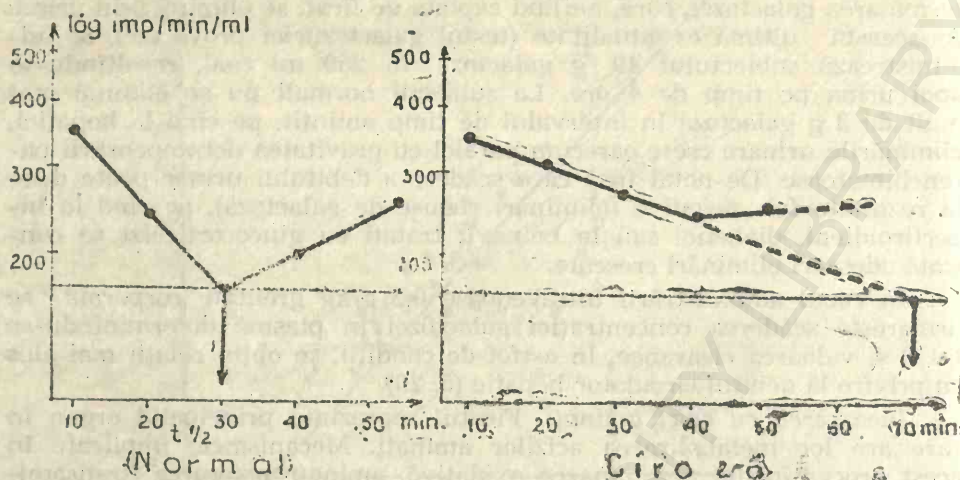


Fig. 4.3. Testul de încărcare cu ^{75}Se metionină. Pe abscisă timpul în minute de la administrarea aminoacidului marcat (7 μCi). Pe ordonată: impulsuri/min/ml (reprezentare logaritmică). Din panta descendentă, indicînd captarea la nivel hepatic a metioninei injectate se poate calcula timpul de înjumătățire biologică (T/2) a metioninei (indicat prin săgeată). Panta ascendentă indică „reîntoarcerea" în plasmă a radioactivității în urma încorporării metioninei marcate în proteinele plasmatice. Se poate vedea că, în comparație cu un subiect sănătos (a), bolnavul cu insuficiență hepatică (b) prezintă atît o încetinire a procesului de captare a metioninei (T/2 prelungit) cît și o întîrziere a încorporării aminoacidului în proteinele plasmatice.

Astfel de amine, nedepurate de către ficatul insuficient sau ajunse în sînge ocolind ficatul prin șunturi, s-au dovedit a avea efecte toxice.

De notat că aminele rezultate prin decarboxilarea fenilalaninei sau tirozinei (de exemplu feniletanolamina), și avînd o structură similară catecolaminelor, pot interfera competitiv cu acestea la nivelul receptorilor adrenergici. S-a sugerat că acești „falși mediatori chimici" ar putea explica atît hipotensiunea cît și fenomenele neuropsihice ale hepaticilor, inclusiv coma hepatică (14).

IV.4. TESTE INDICATOARE ALE COLESTAZEI

Din punct de vedere fiziopatologic, colestaza poate fi definită ca o perturbare în procesul de formare și curgere a bilei și o diminuare a debitului biliar. Această perturbare poate surveni începînd de la nivelul canaliculelor biliare și chiar de la polul biliar al hepatocitelor (postmicrosomal) și pînă la nivelul sfincterului lui Oddi.

Din punct de vedere morfologic, colestaza se caracterizează printr-o acumulare vizibilă de pigmenți biliari în hepatocite și prezența de „trombi biliari" în canaliculele biliare iar sub aspect clinic impresionează marea incidență a pruritului. Aspectele biochimice, care interesează în primul rînd acest capitol, constau din retenția în sînge a componentelor bilei, în primul rînd a acizilor biliari, și din creșterea activității „enzimelor de colestază" și anume fosfataza alcalină, γ-glutamiltransferaza, 5-nucleotidaza și aminopeptidaza (leucinaminopeptidaza).

Modificările biochimice amintite ar avea menirea de a contribui la depistarea unui proces de colestază și eventual să ajute la precizarea mecanismelor prin care s-a ajuns la colestază.

În cazul *colestazelor intrahepatice* (calcul în căile biliare, neoplasm de cap de pancreas, coledocita scleroasă), mecanismul patogenic este relativ simplu și constă din îngustarea sau chiar obstruarea mecanică a căilor biliare extrahepatice.

Patogeneza *colestazelor intrahepatice* este mai complicată și în orice caz mai puțin elucidată la ora actuală. În unele cazuri, examenul histopatologic evidențiază leziuni inflamatorii sclerozante ale căilor biliare intrahepatice (ducturi biliare intralobulare și septale), realizînd aspectul de hepatită colangiolitică și evoluînd spre ciroză biliară. Se ridică însă întrebarea dacă leziunile inflamator sclerozante posibil întreținute și perpetuate prin mecanisme autoimune, nu sînt cumva inițiate de anumite anomalii de metabolism interesînd cu predominanță economia acizilor biliari. O astfel de ipoteză este susținută mai ales de observațiile care atestă rolul esențial al acizilor biliari în formarea fluxului biliar apos. Pe baza datelor din literatură se pot sugera următoarele mecanisme cu rol în dezvoltarea unui proces de colestază de natură metabolică: defecte genetice sau cîștigate ale unor proteine cu rol de receptor sau trasportor care intervin în captarea, stocarea și secreția acizilor biliari; deficit în procesele care generează energia necesară transportului activ intrahepatocitar de acizi biliari (procese ATP-dependente; modificări de permeabilitate ale canaliculelor biliare care ajung să permită o difuziune anarhică a moleculelor secretate activ; anomalii în hidroxilarea acizilor biliari cu repercusiuni asupra solubilității acestora și implicit asupra formării fluxului biliar al canaliculelor; anomalii în procesul de formare al micelilor de acizi biliari, fosfolipide și colesterol; perturbări în elaborarea fluxului biliar apos prin mecanisme independente de acizi biliari (9, 11).

Dacă explorările biochimice sînt în măsură să detecteze existența colestazei, există însă reale dificultăți în a diferenția pe cale biochimică o colestază extrahepatică de una intrahepatică și mai ales în a recunoaște mecanismul implicat în producerea acesteia.

IV.4.1. ENZIMELE INDICATOARE ALE COLESTAZEI

Bazele fiziopatologice ale creșterii în ser a enzimelor indicatoare ale colestazei ca și valoarea diagnostică și limitele fosfatazei alcaline și γ-glutamiltransferazei au fost analizate pe larg în capitolul precedent (vezi pag. 222). Reamintim doar că fosfataza alcalină crește și în afecțiuni osoase, că gradul de creștere al γ-glutamiltrasferazei este mult mai exprimat dar că sensibilitatea acestei determinări enzimatice este contracarată de o oarecare lipsă de specificitate. De fapt, creșteri moderate ale γGT (mai puțin exprimate decît în sindroamele colestatice) se întîlnesc în aproape toate bolile hepatice, valori deosebit de ridicate constatîndu-se în alcoolismul cronic.

IV.4.2. NIVELUL SERIC AL ACIZILOR BILIARI

Trebuie arătat, de la bun început, că o creștere a acizilor biliari în ser se poate datora nu numai colestazei dar și insuficienței hepatice. Pentru înțelegerea acestor aspecte de patologie menționăm că acizii biliari primari (acidul colic și chenodeoxicolic) se sintetizează în ficat, pe seama colesterolului, și după o prealabilă conjugare cu taurina sau glicocolul se varsă prin bilă în intestin.

Aproximativ 98% din acizii biliari secretaţi se reabsorb la nivelul ileonului dar, ajunşi prin circulaţia portală la nivelul ficatului, sînt extrem de rapid captaţi de către hepatocite şi secretaţi în mod activ din nou în bilă, antrenînd totodată un flux biliar apos. O anumită fracţiune a acizilor biliari primari ajunşi în intestin este dehidroxilată sub acţiunea florei microbiene, rezultînd acizi biliari secundari şi anume acidul dezoxicolic (din acidul colic) şi, respectiv, acidul litocolic (din dehidroxilarea acidului chenodeoxicolic). Acidul litocolic este foarte puţin solubil şi se elimină prin fecale sub formă precipitată aderentă de resturi vegetale.

Pe de altă parte, acidul dezoxicolic este parţial reabsorbit în circulaţia portală, fiind apoi captat de ficat şi supus aceluiaşi circuit enterohepatic ca şi acizii biliari primari. Eficienţa remarcabilă a procesului de captare a acizilor biliari din circulaţia portală de către hepatocite face ca nivelul acestor detergenţi biologici să fie deosebit de scăzut în circulaţia sistemică (între 0 şi 6 μmoli/l, cu o medie de 1,6 μmoli/l).

Din cele arătate rezultă că o eventuală suferinţă hepatică poate afecta economia acizilor biliari prin cel puţin trei mecanisme: scăderea sintezei de acizi biliari; reducerea gradului de hidroxilare a acizilor biliari cu repercusiuni asupra solubilităţii acestora şi implicit asupra formării fluxului biliar apos; reducerea capacităţii hepatocitelor de a-i capta, conjuga şi excreta activ în bilă.

Se pare că reducerea capacităţii de captare hepatică a acizilor biliari reabsorbiţi din intestin are o pondere mai mare decît reducerea capacităţii de sinteză deoarece, în marea majoritate a cazurilor de suferinţă hepatică, nivelul seric al acizilor biliari creşte. La scăderea procesului de clearance hepatocitar se adaugă, în cazurile de ciroză, şi prezenţa şunturilor porto-sistemice. Evident că în hepatopatiile colestatice sau în caz de colestază extrahepatică retenţia bilei face ca acizii biliari să reflueze din hepatocite şi din canaliculele biliare în capilarele sinusoide.

Explorarea anomaliilor, afectînd economia acizilor biliari în bolile hepatice, implică următoarele aspecte: determinarea concentraţiei bazale şi postprandiale a acizilor biliari serici, detectarea unor eventuale modificări ale raportului dintre diferiţii acizi biliari şi teste de încărcare orală sau intravenoasă cu acizi biliari (11).

Cele mai importante creşteri ale concentraţiei de acizi biliari serici se constată în sindroamele colestatice precum şi în cursul perioadei floride a unei hepatite acute (valori de 10—50 ori limita superioară a normalului). Creşterile constatate în hepatitele cronice progresive şi în ciroze sînt mai puţin exprimate (3—7 ori limita superioară a normalilor), pe cînd în hepatita cronică persistentă şi în cazurile de ficat grăsos, nivelul acizilor biliari serici se află in apropierea limitei superioare a normalilor sau o depăşeşte de cel mult 2—3 ori.

Eventualele deficienţe în procesul de captare hepatică a acizilor biliari se evidenţiază mai pregnant postprandial, atunci cînd are loc o reabsorbţie de acizi biliari din intestin. De fapt, la două ore după un prînz bogat în grăsimi sau după consumul de gălbenuş de ou, care produce o revărsare de bilă în intestin şi implicit o reabsorbţie de acizi în circulaţia portală, nivelul acestora creşte în circulaţia sistemică de 3—4

ori față de valorile bazale în cazul unei insuficiențe hepatice sau a unui șunt porto-sistemic, pe cînd la normali creșterile sînt abia schițate (10, 11, 12).

Aceeași accentuare a anomaliilor se poate obține prin încărcarea orală cu acizi biliari (7 mg/kg greutate corporală), mai ales la bolnavii cu ciroză hepatică, hipertensiune portală și șunturi portosistemice.

În cazul administrării pe cale intravenoasă a acizilor biliari marcați se explorează mai ales capacitatea de captare a acestora de către hepatocite. Un astfel de test nu este însă accesibil laboratoarelor clinice.

Prin separarea cromatografică a acizilor biliari serici s-a putut arăta că în cazurile evoluînd cu insuficiență hepatică crește mult procentajul acidului dezoxicolic și scade relativ acidul colic, pe cînd în cazurile de colestază, procentul acidului dezoxicolic scade. Fenomenul este ușor de explicat dacă se ține seama că acidul colic este sintetizat de ficat, iar acidul dezoxicolic rezultă din acțiunea florei microbiene intestinale asupra acidului colic. Astfel, în cazurile în care predomină retenția de bilă (colestaza) acizii biliari primari sînt reținuți și refluați în sînge și astfel mai puțin acid colic ajunge în intestin și deci formarea de acid dezoxicolic și implicit absorbția acestuia sînt mai reduse. Pe de altă parte, în insuficiența hepatică scade sinteza de acid colic iar acidul dezoxicolic reabsorbit din intestin nu este captat de hepatocite (12).

Deși nivelul acizilor biliari serici reprezintă un indiciu deosebit de sensibil atît pentru colestază cît și pentru o insuficiență hepatică, valoarea prognostică a acestei investigații este limitată. De fapt, scăderea nivelului seric al acizilor biliari poate surveni atît în caz de ameliorare postterapeutică a capacității de captare a hepatocitelor, cît și a unei insuficiențe hepatice deosebit de severe în care sinteza de acizi biliari este grav compromisă și rezervorul de acizi biliari mult diminuat.

IV.4.3. CREȘTEREA BILIRUBINEI CONJUGATE

Mecanismele care duc la apariția sindromului icteric ar putea fi reprezentate de: o producție excesivă de bilirubină cauzată de o hemoliză; un defect de captare a bilirubinei neconjugate de către hepatocite; un deficit de glicuronoconjugare; o perturbare a procesului de excreție activă a bilirubinei conjugate din hepatocite în canaliculele biliare; o perturbare a formării fluxului biliar apos în căile biliare intrahepatice; o îngustare sau chiar o obstrucție totală a căilor biliare extrahepatice. Primele trei mecanisme duc la creșterea bilirubinei neconjugate (indirecte), pe cînd ultimele trei mecanisme se asociază cu creșteri ale bilirubinei conjugate (directe). Colestaza intrahepatică sau extrahepatică evoluează cu nivele crescute ale bilirubinei conjugate, care poate ajunge (mai ales în cazul icterelor mecanice) la valori de 10—20 mg/dl (170—340 μmol/l). În astfel de cazuri bilirubina conjugată se elimină prin urină, care devine colurică. Este însă important să se precizeze că, în unele cazuri, de colestază intrahepatică, nivelul acizilor biliari este mult mai ridicat decît nivelul bilirubinei directe, a cărei creștere este abia schițată iar pigmenții biliari din urină nu pot fi detectați cu metodele de rutină (3).

În opoziție cu această situație, se pot întîlni cazuri la care creșterea bilirubinei conjugate în ser și în urină nu se asociază cu creșteri ale nivelului seric al acizilor biliari și cu o activitate crescută a fosfatazei alcaline și a γGT. În astfel de cazuri, se poate exclude un proces de colestază, creșterea bilirubinei fiind cauzată de un deficit cu caracter genetic în mecanismele care asigură excreția bilirubinei conjugate (sindrom Dubin-Johnson sau sindrom Rotor). Pe de altă parte, se știe că orice afectare severă a parenchimului hepatic poate duce la creșterea bilirubinei conjugate ca și a acizilor biliari chiar dacă hepatopatia nu are un caracter predominant colestatic.

În caz de obstrucție totală a fluxului biliar (de exemplu, în neoplasm al regiunii ampulare), bilirubina nu ajunge în intestin și din acest motiv nu se formează stercobilinogen (urobilinogen) și respectiv stercobilină. În consecință, materiile fecale devin decolorate iar urobilinogenul nu poate fi detectat în urină.

În condițiile unei obstrucții incomplete sau intermitente (de exemplu, în litiaza biliară sau în colestazele intrahepatice), culoarea scaunului este variabilă, iar urobilinogenul poate apare intermitent în urină (3, 6, 14).

IV.4.4. LIPOPROTEINA X (LpX)

Așa cum s-a arătat într-un capitol precedent (vezi pag. 50), colestaza se însoțește, de regulă, de o creștere în ser a colesterolului liber și a fosfolipidelor care, în unele cazuri, duc la formarea unei lipoproteine particulare specifice colestazei și denumită lipoproteina X. Întrucît această lipoproteină este, în primul rînd, o consecință a retenției de bilă, s-a încercat ca, prin dozări cantitative, să se obțină o diferențiere a colestazei extrahepatice față de colestaza intrahepatică. De fapt, utilizîndu-se metode bazate pe încorporarea de ^{3}H-colesterol în LpX s-a putut arăta (16) că nivelul acestei lipoproteine anormale este în medie de 6 ori mai ridicat în colestazele extrahepatice (158 mg/dl) decît în cele intrahepatice (25 mg/dl). Există însă și numeroase cazuri de hepatită acută, formă colestatică, în care valorile LpX se situează la nivelul celor întîlnite în cazurile de colestază extrahepatică. De notat însă că cele mai ridicate valori ale LpX (peste 1000 mg/dl) se întîlnesc în icterele mecanice de natură malignă (de exemplu, în carcinoame ale capului pancreasului). S-a mai arătat că în numeroase cazuri de colestază intrahepatică cronică (ciroză biliară), se constată o creștere a α lipoproteinelor cu migrare încetinită (22).

Deși determinările de LpX au o valoare discriminativă mai mare decît dozările de fosfatază alcalină, γGT sau acizi biliari pentru diferențierea diverselor forme de colestază, dificultățile tehnice și costul ridicat al unor determinări, necesitînd colesterol marcat, au făcut ca această examinare să nu poată fi utilizată de rutină în laboratoarele clinice. În consecință, testele biochimice au la ora actuală o valoare limitată pentru diferențierea colestazei intrahepatice de cea extrahepatică.

IV.4.5. PARTICULARITĂȚI ALE SINTEZEI DE PROTEINE HEPATICE ÎN COLESTAZĂ

Așa cum s-a mai arătat (vezi pag. 156), retenția cronică de bilă stimulează sinteza hepatică de proteine. Ca urmare, în cazurile de ciroză biliară se constată creșteri importante ale nivelului unor proteine plasmatice de proveniență hepatică. Aceste creșteri interesează nu numai fosfataza alcalină și γ-glutamiltransferaza, dar și unii factori ai coagulării, inhibitorii proteazelor, haptoglobinele, proteina C_3 a complementului și ceruloplasmina (7). În schimb, nivelul prealbuminei și albuminei serice, precum și activitatea colinesterazei serice scad (22).

IV.5. EXPLORĂRI CU ROL DE PRECIZARE A ETIOLOGIEI UNEI BOLI HEPATICE

Diagnosticul complet al unei suferințe hepatice necesită stabilirea în măsura posibilului a factorilor etiologici implicați. Redăm în tabelul 4.1 o prezentare succintă a acestor factori etiologici.

Investigațiile amintite furnizează mai ales informații cu privire la mecanismele patogenetice și dau doar relații indirecte privind etiologia unei boli hepatice.

Anamneza și investigațiile toxicologice pot ajuta la precizarea naturii toxice a unei suferințe hepatice, iar nivelul mult crescut al γGT față de cel al fosfatazei alcaline poate atrage atenția asupra factorului alcoolism.

S-a mai arătat (vezi pag. 105) că determinările de α-fetoproteină pot preciza diagnosticul de carcinom hepatic. Studiile din ultimii 20 de ani au dus la stabilirea *agenților etiologici ai hepatitelor virale* precum și a rolului lor în cronicizarea acestor afecțiuni. Deși studiul virusurilor depășește cadrul unei cărți axate pe probleme de biochimie, relatăm câteva criterii de interpretare a rezultatelor furnizate de laboratoarele care pot pune în evidență prezența în ser a virusurilor hepatotrope sau a anticorpilor față de aceste virusuri.

Tabelul 4.1

Factori etiologici incriminați în producerea bolilor hepatice

A. **Factori infecțioși (implicând și reacție imună)**
  a) *Infecții virale*
    — Hepatitele virale A, B sau nonA — nonB
    Mononucleoza infecțioasă, febra galbenă, hepatita neonatală dată de variate virusuri.
  b) *Infecții bacteriene:* leptospiroza, bruceloza, tuberculoza, lepra, lues.
  c) *Infecții micotice:* actinomicoză, histoplasmoză
  d) *Infecții cu protozoare:* amebiază, malarie
  e) *Infestații cu helminți:* schistosomiază, chist hidatic

B. **Factori toxici:** ciuperci, alcool, Cl_4C, halotan, tiomazol, clorpromazină, contraceptive orale, PAS,izoniazidă

C. **Factori nutriționali:** carența de proteine (Kwashiorkor), carența de vitamine

D. **Factori metabolici:** glicogenoze, galactozemie, porfirii, boala Gaucher.

E. **Factori carcinogeni:** aflatoxine (din mucegaiuri), nitrozamine

F. **Factori circulatori:** insuficiența cardiacă — ficatul de stază.

G. **Factori necunoscuți**

S-a remarcat astfel existenţa unei hepatite virale de tip A, de tip B şi de tip non A — non B, ultimele două tipuri ducînd la apariţia de purtători cronici (cu posibilitatea de răspîndire în continuare a virusului), precum şi la cronicizarea afecţiunii care poate surveni într-un procent destul de ridicat al cazurilor.

S-a mai descris existenţa unei hepatite de tip D, dată de agentul delta. Pentru ca acest aşa-zis „virus defectiv" sau incomplet să se poată replica şi deci să producă hepatita este nevoie ca, în organismul gazdei, să fie prezent virusul B. Şi acest virus al hepatitei D favorizează evoluţia spre cronicizare. Din cele expuse rezultă că evidenţierea virusurilor menţionate ar putea aduce nu numai informaţii etiologice dar şi cu caracter prognostic.

De fapt, singurul virus pentru care s-au dezvoltat tehnici de determinare accesibile unui laborator clinic este cel al hepatitei B. Studiile de imunologie au evidenţiat mai mulţi antigeni legaţi de acest virus. Aşa de exemplu, învelişul virusului (surface, suprafaţa) este dotat cu un antigen caracteristic AgHBs (denumit şi antigenul Australia), iar miezul (core) prezintă un alt antigen specific AgHBc. S-a mai descris un antigen AgHBe a cărui prezenţă în ser este un indiciu al concentraţiei virionului şi deci al potenţialului infecţios. Antigenelor amintite le corespund anticorpi specifici anti HBs, HBc şi HBe.

În hepatita virală acută, AgHBs apare în ser cu 2—4 săptămîni înaintea creşterii aminotransferazelor şi cu 3—5 săptămîni înaintea apariţiei simptomelor clinice. Nivelul seric al antigenului ajunge la maxim în momentul debutului clinic şi apoi scade, în majoritatea cazurilor după alte 4—6 săptămîni, devenind nedetectabil prin metodele curente.

O dată cu necroza celulelor sau în orice caz o dată cu creşterea permeabilităţii membranei hepatocitelor şi respectiv creşterea activităţii serice a aminotransferazelor se eliberează din celule AgHBc şi AgHBe care se pot evidenţia în ser. Acest proces duce la formarea de anticorpi anti HBc de tip IgM. Nivelele crescute de anticorpi anti HBc din cursul infecţiei acute persistă şi în perioada de convalescenţă (atunci cînd AgHBs poate lipsi). Este important de arătat că într-o hepatită cronică şi chiar într-un puseu evolutiv al bolii, anticorpii HBc nu sînt detectabili, permiţînd diferenţierea acestor forme faţă de o hepatită acută.

Pe de altă parte, prezenţa AgHBs indică o infecţie activă cu virus B, în faza acută, cronică sau latentă (purtători). În 5% din cazurile de infectaţi, AgHBs nu este detectabil, fiind prezenţi doar anticorpii anti HBc. În absenţa AgHBs şi AgHBc se poate exclude o hepatită activă de tip B.

Starea de purtător cronic de AgHBs se defineşte prin prezenţa acestui antigen viral în circulaţie fără ca probele hepatice să fie alterate şi fără ca aspectul histologic al punctatului bioptic să prezinte modificări patologice.

Nu trebuie uitat însă că aproximativ 20—30% din hepatitele cronice au prezent antigenul HBs în ser şi reprezintă, ca şi purtătorii, un potenţial de infectare (1, 13, 15, 17).

Problemele legate de interpretarea diverselor teste de explorare a ficatului în variatele forme clinice și variante ale bolilor hepatice se pretează la ample discuții. Este destul a aminti că în hepatologia clinică a lui Kühn și Wernze, probele funcționale scrise de 28 colaboratori însumează 128 pagini. Considerăm însă că, deși relativ restrîns, materialul prezentat în acest capitol, coroborat cu datele prezentate în cadrul proteinelor plasmatice și a patologiei enzimelor, este în măsură să orienteze cititorul în privința posibilității de detectare, prin explorări biochimice, a principalelor sindroame care survin în bolile ficatului.

Redăm în tabelul 4.2. o prezentare sinoptică a comportării probelor de laborator în cîteva boli hepatice mai frecvent întîlnite.

Tabelul 4.2

Reprezentarea schematică a comportării principalelor teste biochimice de explorare a ficatului în cîteva boli hepatice mai frecvent întîlnite. Prescurtări folosite: AST — aspartataminotransferază (GOT); ALT = alaninaminotransferază (GPT); LDH = lactatdehidrogenază; GLDH = glutamatdehidrogenază; CHE = colinesterază; Fact. coag. = factorii complexului protrombinic; AlP = fosfatază alcalină; γGT = γ—glutamiltransferază; Alb. = albumină serică; Ac. bil. = acizi biliari serici; Bilirub. = bilirubină serică; Clear. Ap. = clearance antipirinic; N — în limite normale.

Natura îmbolnăvirii	Imunoglobuline (inflamaţie cronică)	Teste de creştere a permeabilităţii membranei	Indicatori ai funcţiei	Indicatori ai colestazei	Observaţii
1	2	3	4	5	6
Hepatită acută	IgG: ↑ IgA: ↑ IgM: ↑↑	AST: ↑↑—↑↑↑↑ ALT: ↑↑↑—↑↑↑↑ GLDH: ↑—↑↑↑	Alb: N—↓ CHE: ↓—↓↓ Fact. coag.: ↓↓—↓↓↓ Clear Ap: nu se efectuează	AlP: ↑↑—↑↑↑ γGT: ↑↑—↑↑↑ Ac. bil: ↑↑—↑↑↑ Bilirub: N—↑↑↑	Forme de gravitate diferită. Se va căuta precizarea etiologiei (AgHBs etc.)
Intoxicaţie acută (Cl_4C, ciuperci, etc.)	Puţin modificate	AST: ↑↑↑↑↑ ALT: ↑↑↑↑↑ LDH: ↑↑↑↑↑ GLDH: ↑↑↑↑	Alb: N—↓ CHE: ↓—↓↓↓ Fact. coag.: ↓↓↓↓ Clear Ap: nu se efectuează	AlP: ↑—↑↑ γGT: ↑—↑↑↑ Ac. bil.: ↑↑↑ Bilirub.: ↑↑↑	Analiza toxicologică Anchetă la locul de muncă. Informaţii de la aparţinători
Hepatită cronică activă (progresivă)	IgG: ↑↑↑↑ IgA: ↑↑ IgM: ↑↑	AST: ↑↑↑ ALT: ↑↑ GLDH: ↑↑	Alb: ↓—↓↓ CHE: ↓—↓↓ Fact. coag.: ↓—↓↓ Clear. Ap: ↓—↓↓	AlP: ↑↑ γGT: ↑↑ Ac. bil.: ↑↑ Bilirub, N—↑↑	Agravări corespunzînd unor puseuri necrotice Se va preciza etiologia
Hepatită cronică persistentă (stabilizată)	IgG: ↑ IgA: ↑ IgM: N—↑	AST: N—↑ ALT: N—↑ GLDH: N—↑	Alb: N CHE: N—↓ Fact. coag. N Clear. Ap: N—↓	AlP: N γGT: N—↑ Ac. bil.: N—↑ Bilirub.: N	Nu exclude riscul trecerii într-o formă activă

Tabelul 4.2 (continuare)

1	2	3	4	5	6
Alcoolism cronic	IgG: N—↑ IgA: ↑—↑↑↑ IgM: N—↑	AST: ↑↑—↑↑↑ ALT: ↑—↑↑↑ GLDH: N—↑↑	Alb: N CHE: variabil Fact. coag. N Clear. Ap: N	AlP: ↑ γGT: ↑↑↑↑ Ac. bil.: N Bilirub.: N	Steatoză hepatică Aminotransferazele cresc în puseuri. Evoluție spre ciroză
Ciroză decompensată	IgG↑↑—↑↑↑↑ IgA↑↑—↑↑↑ IgM↑—↑↑	AST N—↑↑ ALT N—↑ GLDH N—↑↑	Alb.↓↓ CHE↓↓↓—↓↓↓↓ Fact.coag.↓—↓↓↓ Clear.Ap.↓↓↓—↓↓↓↓	AlP: N—↑ γGT↑—↑↑ Ac. bil ↓↓—↑↑↑ Biiibrub.↑—↑↑	Variații în funcție de etiologie și de eventuale pusee evolutive (necrotice)
Colestază intrahepatică (ciroză biliară)	IgG↑—↑↑↑ IgA↑—↑↑↑ IgM↑↑—↑↑↑↑	AST↑—↑↑ ALT↑—↑↑ GLDH↑—↑↑	Alb↓ CHE↓—↓↓↓↓ Fact.coag.↑ Clear Ap.↓↓—↓↓↓	AlP↑↑↑—↑↑↑↑ γGT↑↑↑↑ Ac. bil.↑↑↑↑↑ Bilirub.↑—↑↑↑	Creșteri ale C3, haptoglobinei, ceruloplasminei
Colestază extrahepatică (icter mecanic)	IgG N—↑ IgA N—↑ IgM N—↑	AST: N—↑↑ ALT: N—↑ GLDH N—↑	Alb N—↓ CHE N—↓↓↓ Fact. coag. N—↓↓ Clear Ap. N—↓↓	AlP↑↑↑↑ γGT↑↑↑↑↑ Ac. bil.↑↑↑↑↑ Bilirub. ↑↑↑↑	Probele funcționale se alterează în timp; factorii coagulării scad în caz de deficit de vit. K. Se va preciza etiologia (neoplasm de cap de pancreas, calcul)
Procese tumorale	IgG N—↑ IgA N—↑ IgM N—↑	AST N—↑↑ ALT N—↑ GLDH N—↑	Alb. N—↓ CHE↓—↓↓ Fact. coag. N—↑ Clear Ap. N—↓	AlP:↑↑—↑↑↑ γGT↑↑—↑↑↑↑ Ac. bil. N—↑ Bilirub. N—↑	Nu se referă la neoplasmele evoluînd cu icter mecanic. În adenocarcinomul hepatic creșterea α-fetoproteinei

BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

1. Barbu, N., Străin, R., Novac, E., *Antigenul Australia*, Ed. Facla, 1977.
2. Bedeleanu, D., Trif, I., Lötsch, I. K., Cucuianu, M., *Increased values of antipyrine clearance in type IV hyperlipoproteinemia*, Rev. Roum. Med. Med. Int., 1986, 24, 183–190.
3. Berk, P. D., Javitt, N. B., *Hyperbilirubinemia and cholestasis*, Amer. J. Med., 1978, 64, 311–326.
4. Biland, L., Duckert, F., Prisender, S., Nyman, D., *Quantitative estimation of coagulation factors in liver disease. The diagnostic and prognostic value of factor XIII, factor V and plasminogen*, Thrombos. Haemostasis. (Stuttg.), 1978, 39, 646.
5. Branch, R. A., *Drugs as indicators of hepatic function*, Hepatology, 1982, 2, 97–105.
6. Buligescu, L., *Bolile ficatului, căilor biliare și pancreasului*, Ed. Medicală, București, 1981.
7. Cederblad, C., Korsan-Bengtsen, K., Olsson, R., *Observation of increased levels of blood coagulation factors and other plasma proteins in cholestatic liver disease*, Scand. J. Gastroenterol., 1976, 11, 391.
8. Cucuianu, M., *Biochimie clinică a hemostazei*, Ed. Dacia, Cluj-Napoca, 1983.
9. Cucuianu, M., Olinic, N., Goia, A., Fekete, T., *Biochimie clinică*, vol. II, Ed. Dacia, Cluj-Napoca, 1979.
10. Fausa, O., Gjone, F., *Serum bile acid concentration in patients with liver disease*, Scand. J. Gastroenterol., 1976, 11, 537–543.
11. Grigorescu, M., Tăpălagă, D., Dumitrașcu, D., *Patologia clinică a acizilor biliari*, Ed. Dacia, Cluj-Napoca, 1983.
12. Iwamura, K., *Bile acid metabolism and liver diseases*, Das Medizinische Prisma, 1982, 3, 1–27.
13. Kruger, P., *Significance of anti HBc IgM in the differential diagnosis of viral hepatitis*, J. Virol. Methods, 1985, 10, 283.
14. Kühn, H. A., Wernze, H., *Klinische Hepatologie*, Ed. G. Thieme, Stuttgart, 1979.
15. Popescu, Șt., *Progrese și incertitudini în patogeneza hepatitei asociate cu infecția cronică prin virus B*, Clujul Medical, 1986, 2, 103–112.
16. Ritland, S., *Quantitative determination of the abnormal lipoprotein of cholestasis, LP-X, in liver disease*, Scand. J. Gastroent., 1975, 10, 5–15.
17. Rose, N. L., Fridman, M., Fahey, I. L., *Manual of clinical laboratory immunology*, American Society for Microbiology, Washington D.C., 1986.
18. Sherlock, S., *Diseases of the liver and biliary system*, Fifth Edition, Ed. Blackwell, London, 1975.
19. Skrede, S., Blomhoff, I. P., Gjone, E., *Biochemical features of acute and chronic hepatitis*, Annals of clinical research, 1976, 8, 182–199.
20. Spoelstra, P., *Antipyrine metabolism in liver disease*, Teză de doctorat, Univ. Leiden, 1986, 119 pag.
21. Szantay, I., Cotul, S., Gidali, M., *La détermination de la demi-vie (T/2) de la ^{75}Se-méthionine du sang et l'étude de la vitese de son incorporation dans les protéines plasmatiques*, Rev. Int. Hépatol., 1968, 18, 663.
22. Tăpălagă, D., Opincaru, A., Cucuianu, M., *Hepatic secretion enzymes and electrophoretic lipoprotein fractions in liver disease*, Acta Hepato-Gastroenterol., 1979, 26, 9–16.

V BIOCHIMIA SECREŢIEI BILIARE
(Metabolismul pigmenţilor şi acizilor biliari)

Bila formată în lobulii hepatici este secretată într-o reţea complexă de canalicule şi ducturi biliare care, prin confluenţă, îşi cresc progresiv dimensiunile şi ajung în spaţiile portale situate între lobulii hepatici, alături de limfatice şi de ramurile venei porte şi ale arterei hepatice. Ductul (canalul) hepatic, alcătuit prin confluenţa ducturilor hepatice drept şi stîng, se uneşte cu canalul cistic al veziculei biliare formînd canalul coledoc (ductul biliar comun), care intră în duoden prin ampula lui Vater, de regulă împreună cu ductul pancreatic principal (16, 19).

Principalele componente ale bilei sînt apa (82%), acizii biliari (12%), fosfolipidele (4%) şi colesterolul neesterificat (0,7%). Bila mai conţine bilirubină conjugată, imunoglobulina A, electroliţi, mucus şi produşi de metabolizare a unor proteine, a unor hormoni sau a unor medicamente (14, 16).

Volumul bazal zilnic al secreţiei de bilă este de 500—600 ml. Aşa cum se poate constata (vezi pag. 281), reglarea fluxului biliar se realizează prin mecanisme care ţin de transportul activ de acizi biliari din hepatocite în canaliculele biliare precum şi de mecanisme independente de acizii biliari.

În cele ce urmează sînt analizate căile metabolice ale bilirubinei şi acizilor biliari care constituie principalii anioni organici ai bilei şi prezintă totodată o deosebită importanţă pentru diagnosticul de laborator.

V.1. METABOLISMUL BILIRUBINEI

Blirubina este un tetrapirol liniar liposolubil care este derivat din catabolismul enzimatic al fracţiunii hem din variatele hemoproteine aflate în întregul organism. Înţelegerea modificărilor suferite de nivelul plasmatic al bilirubinei în condiţii patologice şi diferenţierea sindroamelor icterice implică o prealabilă cunoaştere a mecanismelor de formare, conjugare şi eliminare a acestui compus.

V.1.1. FORMAREA BILIRUBINEI

Sursa de bilirubină este reprezentată, în primul rînd, de hemoglobina hematiilor îmbătrînite în circulaţie care se distrug în macrofagele din sistemul reticuloendotelial.

De fapt prin marcarea hemoproteinelor cu ^{15}N-glicocol, care se încorporează în moleculele de hem nou sintetizate, și prin urmărirea apariției radioactivității în bilirubina și în metaboliții ei din materiile fecale se constată că peste 80% din această radioactivitate se găsește în scaun după aproximativ 120 de zile de la administrarea trasorului. Acest interval de timp corespunde cu „limita de vîrstă a hematiilor" și denotă că bilirubina marcată provine mai ales din hematiile îmbătrînite. Aproximativ 15—20% din ^{15}N-glicocolul injectat apare însă încorporat în bilirubină încă din primele zile de la administrare. Este evident că această „bilirubină marcată precoce" nu poate proveni din hemoglobina hematiilor îmbătrînite, iar sursa ei pare a fi reprezentată din diverse hemoproteine hepatice (citocromi, oxidaze, catalaze) care au o viteză de remaniere foarte rapidă (turnover accelerat). O altă parte a acestei bilirubine marcată precoce provine din distrucția intramedulară a unor elemente tinere din seria eritrocitară (eritron), care abia începuseră să încorporeze glicocolul marcat în hemoglobină. În condițiile unei eritropoieze ineficiente (anemii megaloblastice, anemii sideroblastice, talasemii), cînd se produce o perturbare în procesul de maturare și lansare în circulație a elementelor seriei roșii, procentul de bilirubină formată prin hemoliza intramedulară, poate depăși 50% din totalul bilirubinei excretate (24).

Mecanismul enzimatic care catalizează desfacerea oxidativă a inelului tetrapirolic (porfirinic) al moleculei de hem și duce la formarea de bilirubină implică cel puțin două etape. Într-un prim timp, sub acțiunea *hemoxigenazei* și în prezența de oxigen molecular, NADPH, flavoproteină și citocrom P 450 are loc o descompunere a hemului care eliberează Fe, CO și biliverdină. În continuare, biliverdina este redusă apoi spre bilirubină sub acțiunea *biliverdinreductazei* (vezi fig. 5.1.). Viteza acestor reacții, respectiv capacitatea de transformare a hemului în bilirubină, este deosebit de mare. Se explică astfel faptul că, în anemiile hemolitice, se ajunge la hiperbilirubinemie și doar, rareori, la hemoglobinemie și hemoglobinurie. Cu alte cuvinte, viteza de eliberare a hemoglobinei în cursul hemolizelor patologice depășește doar în mod excepțional, și atunci doar pe o perioadă scurtă de timp, viteza de degradare a hemului și formarea de bilirubină (4, 24).

Locul de producere al bilirubinei este reprezentat de macrofagele aflate în diverse țesuturi și mai ales în splină, ficat (celule Kupffer) și ganglionii limfatici. Se pare că sistemul enzimatic care catalizează formarea bilirubinei este inductibil, crescîndu-și activitatea atunci cînd se acumulează substratul asupra căruia acționează (respectiv hemoglobina). Așa de exemplu, activitatea hemoxigenazei din macrofagele pielii crește în mod apreciabil atunci cînd aceste celule vin în contact cu hemoglobina, respectiv în urma revărsării de sînge în țesutul cutanat. Așa se explică de altfel transformarea culorii hematoamelor de la roșu violet (hemoglobină redusă) spre albastru verzui și apoi spre galben (bilirubină). În cele din urmă, bilirubina formată local este transportată de la locul de formare după o prealabilă fixare pe albumina serică. De notat că, prin expunere la lumină vizibilă albastră (430—470 nm), bilirubina se transformă în izomeri metastabili polari și deci hidrosolubili care pot fi excretați prin urină și chiar prin bilă fără a fi fost conjugați cu acidul glicuronic (4, 24).

SISTEM
RETICULO ENDOTELIAL

MADUVA

Distructia
hematiilor
îmbătrînite

Distructia
celulelor
din eritron

80–85 %

FICAT

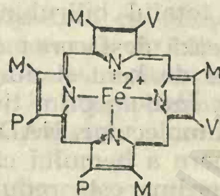
15–20 %

Turnover al
unor hemo-
proteine
hepatice

HEMOGLOBINA

globina

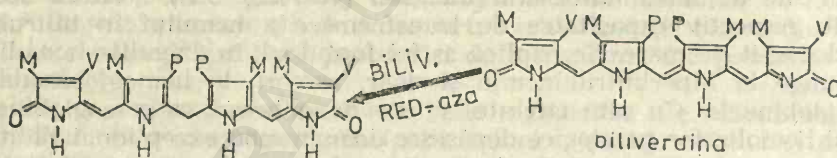
Hem



HEMOXIGENAZA

CO

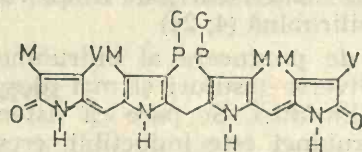
Fe^{2+}



bilirubina

LUMINA

GLICURONIL
TRANSFERAZA



bilirubin diglucuronid
(conjugata)

izomeri
hidrosolubili

urobilinogeni

EXCRETIE FECALE

Fig. 5.1. Mecanismul enzimatic de formare a bilirubinei din hemoglobină și alte hemoproteine. *M* — metil; *V* — vinil; *P* — propionil; *G* — glicuronat; Biliv —RED-aza — biliverdin reductaza.

V.1.2. TRANSPORTUL, CONJUGAREA ȘI ELIMINAREA PRIN BILĂ A BILIRUBINEI

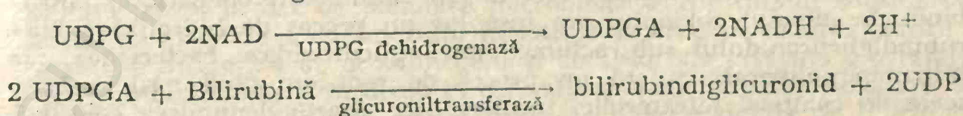
Fiind liposolubilă, bilirubina formată în macrofage poate pătrunde cu ușurință prin membranele celulare de natură lipoidică, iar, în cazul unor concentrații excesiv de ridicate, poate provoca leziuni severe în celulele sistemului nervos central. Aceste efecte nocive ale bilirubinei liposolubile sînt contracarate în organism prin cel puțin două mecanisme: a) fixarea bilirubinei pe albuminele serice, asigurîndu-se astfel retenția pigmentului în lumenul vascular și limitîndu-se difuzarea lui în țesuturi; b) formarea de glicuronoconjugați ai bilirubinei care devine astfel hidrosolubilă nu mai pătrunde în mebranele lipoidice ale celulelor și nu este toxică pentru sistemul nervos, fiind de altfel rapid eliminată prin bilă.

Se știe astăzi că bilirubina pătrunsă în plasmă se leagă în mod reversibil (necovalent) de albumina serică, capacitatea maximă de fixare fiind de 2 moli bilirubină pentru un mol de albumină. Este important de precizat că o serie de substanțe micromoleculare, ca de exemplu sulfamidele și salicilații precum și acizii grași liberi, intră în competiție cu bilirubina pentru situsurile de fixare pe molecule de albumină. Datorită caracterului discontinuu al capilarelor sinusoide, complexul albumină-bilirubină ajunge în contact nemijlocit cu hepatocitele, astfel încît aceste celule pot prelua bilirubina.

Mecanismele intime care asigură pătrunderea bilirubinei în hepatocite nu sînt încă pe deplin elucidate. Se știe însă că acest proces implică o prealabilă desfacere a bilirubinei de pe albumină și s-a demonstrat că o serie de anioni organici cum sînt bromsulfonftaleina, (BSP) și verdele de indocianină intră în competiție cu bilirubina, fiind captate deci prin aceleași mecanisme. În schimb, acizii biliari pătrund în hepatocite prin mecanisme specifice cu totul diferite de bilirubină și de coloranții amintiți (4, 18).

În principiu, bilirubina pătrunsă în hepatocite, fiind liposolubilă, s-ar putea reîntoarce în plasmă, difuzînd prin membrana lipoidică a celulelor. Acest proces este însă mult limitat prin cel puțin două mecanisme: fixarea bilirubinei pe anumite proteine din citosolul hepatocitelor, cu rol de legare a anionilor organici, și denumite ligandine, și prin glicuronoconjugare (vezi fig. 5.2).

Procesul de glicuronoconjugare a bilirubinei este catalizat de bilirubin-glicuroniltransferaza localizată la nivelul microsomilor hepatici. Acidul glicuronic provine din nucleotidul uridindifosfat-acid glicuronic (UDPGA) care, la rîndul său, este format prin dehidrogenarea uridindifosfatglucozei (UDPG). Conform acestor detalii biochimice denumirea științifică a enzimei care asigură glicuronoconjugarea bilirubinei ar fi bilirubinuridindifosfatglicuroniltrasferaza (UDPGT).



$$\text{UDPG} + 2\text{NAD} \xrightarrow[\text{UDPG dehidrogenază}]{} \text{UDPGA} + 2\text{NADH} + 2\text{H}^+$$

$$2\ \text{UDPGA} + \text{Bilirubină} \xrightarrow[\text{glicuroniltransferază}]{} \text{bilirubindiglicuronid} + 2\text{UDP}$$

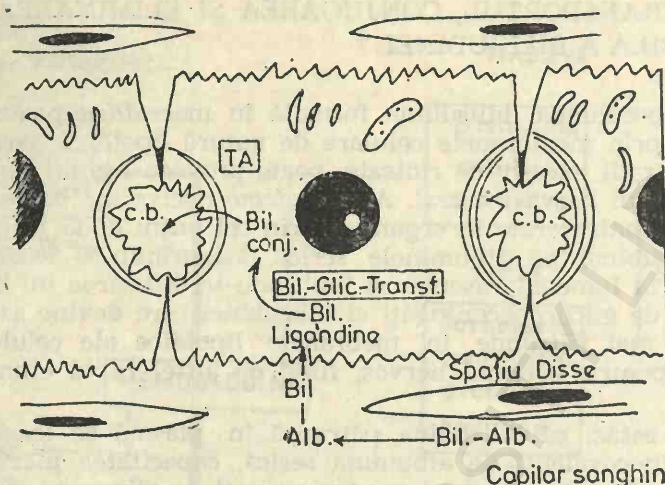


Fig. 5.2. Reprezentare schematică a proceselor de captare în hepatocite a bilirubinei neconjugate, de glicuronoconjugare a acesteia şi de excreţie activă a bilirubindiglicuronidului în canaliculele biliare; *Bil-Alb* — Bilirubină neconjugată fixată pe albumină; *Bil-Conj* — bilirubină conjugată; *Bil-Glic-Transf.* — sistemul enzimatic de glicuronoconjugare a bilirubinei; *TA* — sistem de transport activ a bilirubinei conjugate din hepatocite în canaliculele biliare (c.b.).

Aproximativ 85% din bilirubina conjugată şi eliminată prin bilă se găseşte sub formă de diglicuronid şi doar 25% sub formă de monoglicuronid. Prin creşterea grupărilor polare, ca urmare a glicuronoconjugării, bilirubina devine hidrosolubilă şi este astfel excretată în bilă.

Se ştie astăzi că excreţia bilirubinei este asigurată de un mecanism de transport canalicular energodependent şi saturabil care poate fi depăşit atunci cînd aportul de pigment spre sistemul de excreţie este excesiv. Ca şi în privinţa procesului de captare, excreţia bilirubinei intră în competiţie cu BSP şi cu verdele de indocianină dar nu şi cu acizii biliari. Este, de asemeni, evident că îndepărtarea bilirubinei excretate în canaliculele biliare depinde de un flux biliar apos adecvat. De notat că, spre deosebire de procesul de glicuronoconjugare, cel de excreţie al bilirubinei conjugate este rapid afectat de suferinţa hepatocitelor (4, 16).

V.1.3. TRANSFORMĂRILE SUFERITE DE BILIRUBINĂ ÎN INTESTIN. UROBILINOGENII

Bilirubina glicuronoconjugată revărsată cu bila în intestin nu este reabsorbită de mucoasa intestinală astfel încît, spre deosebire de cazul acizilor biliari, nu se poate vorbi de un circuit enterohepatic al bilirubinei. La nivelul colonului are însă loc un proces de hidroliză a bilirubindiglicuronidului sub acţiunea unei glicuronidaze bacteriene, iar bilirubina eliberată suferă un proces de reducere dînd naştere la o serie de compuşi tetrapirolici incolori care poartă denumirea colectivă

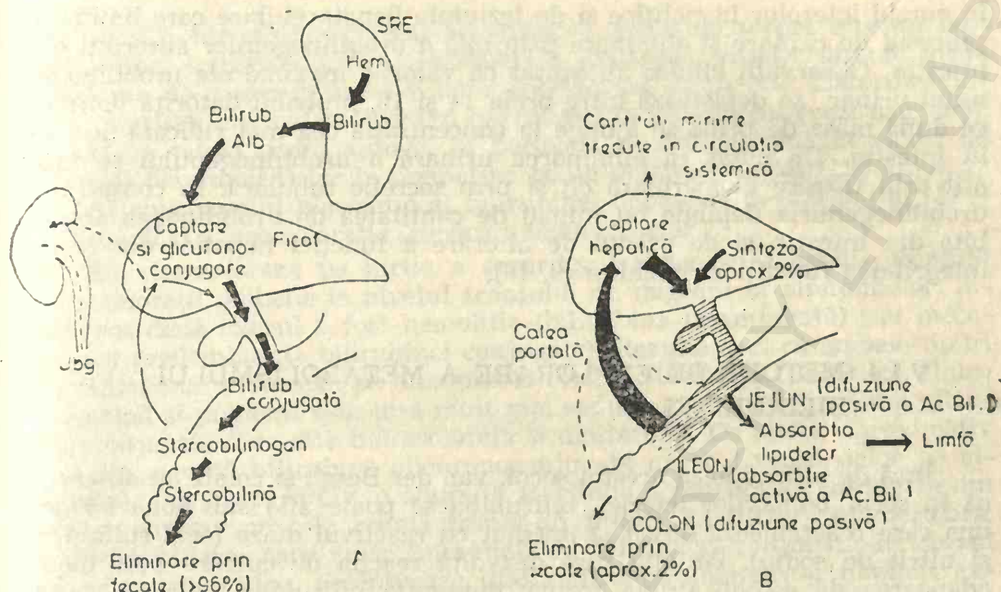


Fig. 5.3. **Comportarea diferită a pigmenților biliari (A) și a acizilor biliari (B) în tractul digestiv. În timp ce pigmenții biliari constituie un deșeu care se elimină prin fecale sub formă de stercobilină, acizii biliari reprezintă un capital prețios care se reabsoarbe aproape integral în cadrul circulației enterohepatice. Se poate vedea că cea mai mare parte a acizilor biliari secretați în bilă provin din reabsorbția intestinală activă la nivelul ileonului. Detalii în text.**

de urobilinogeni (stercobilinogeni). O fracțiune din acești urobilinogeni se reabsoarbe la nivelul colonului și pătrunde în circulația portală, dar, ajunsă la ficat, este rapid captată de hepatocite și excretată în bilă printr-un proces activ energodependent. Doar mici cantități de urobilinogeni (0—4 mg/24h) scapă în vena suprahepatică sau ajung în circulație prin plexurile venoase hemoroidale și apar astfel în urină. Acest urobilinogen urinar excretat în mod normal este însă sub limita posibilităților de detectare cu metodele de rutină utilizate în laboratorul clinic (reactiv Ehrlich). Cea mai mare parte a urobilinogenilor din intestin este oxidată spre stercobilină și se elimină prin fecale, cărora le conferă culoare brună (fig. 5.3).

Cantitatea totală de urobilinogeni și stercobilină eliminată prin fecale în decurs de 24 de ore oscilează, la subiecții normali, între 50 și 280 mg și corespunde, în mare măsură, cu eliminările de bilirubină în bilă. Este evident însă că în caz de tranzit intestinal accelerat sau în urma distrugerii florei microbiene printr-un tratament susținut cu antibiotice formarea de urobilinogeni din bilirubină este mult limitată. Pe de altă parte, în caz de populare microbiană a intestinului subțire sau în caz de stagnare a conținutului intestinal se creează condiții pentru o producție accelerată de urobilinogeni și de absorbție crescută a acestora, care se elimină apoi prin urină în cantități sporite. Principalele cauze ale urobilinogenuriei sînt însă reprezentate de hiperproducția de bilirubină

în cursul icterelor hemolitice și de leziunile hepatocelulare care limitează procesul de captare și eliminare prin bilă a urobilinogenilor absorbiți din intestin. Observații clinice au arătat că valorile maxime ale urobilinogenului urinar se depistează între orele 14 și 16, probabil datorită faptului că după masa de prînz se ajunge la concentrația cea mai ridicată de bilă în intestin. De notat că eliminarea urinară a urobilinogenului se face atît prin filtrare glomerulară cît și prin secreție tubulară. În consecință, urobilinogenuria depinde nu numai de cantitatea de urobilinogen absorbită din intestin și de gradul de alterare a funcției hepatice dar și de integritatea funcțiilor rinichilor (9, 16).

V.1.4. METODE DE EXPLORARE A METABOLISMULUI BILIRUBINEI

Încă de la începutul acestui secol, van der Bergh și colab. au observat că în serul bolnavilor icterici, bilirubina se poate afla sub două forme: una care reacționează direct și imediat cu reactivul diazo (acid sulfanilic și nitrit de sodiu), iar alta care dezvoltă reacția de culoare doar după adăugarea de alcool. Prima formă, denumită bilirubină directă, era crescută în serul bolnavilor cu ictere mecanice, pe cînd cea de a doua, denumită bilirubină indirectă, creștea în serul bolnavilor cu icter hemolitic. Ulterior, s-a demonstrat că bilirubina directă este de fapt forma glicuronoconjugată a bilirubinei, pe cînd cea indirectă este o bilirubină neconjugată. Metodele cromatografice au fost în măsură să diferențieze nu numai bilirubina neconjugată de cea conjugată dar au evidențiat și existența de bilirubină conjugată cu o singură moleculă de acid glicuronic (monoglicuronid) sau cu două molecule (diglicuronid). Determinarea diferențiată a monoglicuronidului față de diglicuronid are importanță mai ales în cazul unor anomalii genetice ale procesului de glicuronoconjugare (vezi pag. 269), iar în practica curentă se recurge la determinări de bilirubină directă și indirectă cu ajutorul reacției diazo. Astfel, bilirubina glicuronoconjugată, care este hidrosolubilă, reacționează prompt cu acidul sulfanilic diazotat formînd un complex colorat, azobilirubina, care la pH alcalin este albastru, iar în mediu acid sau neutru este roșu. Bilirubina neconjugată care nu este solubilă în apă reacționează cu reactivul diazo doar după o probabilă tratare a serului cu alcool etilic sau metilic sau în prezența a diverși acceleratori de reacție (cofeină, benzoat de sodiu, salicilat, antipirină, piridină, acetamidă etc.). În astfel de condiții, reacția de culoare este dată atît de bilirubina directă (conjugată) cît și de cea indirectă (neconjugată), iar valoarea obținută constituie o măsură a bilirubinei totale. Valoarea bilirubinei indirecte (neconjugate) se obține din diferența între bilirubina totală și cea directă.

La subiecții normali, nivelul bilirubinemiei totale se situează între 0,3—1 mg/dl (5,1—17 μmoli/l), iar bilirubina directă reprezintă, de regulă, mai puțin de 10% din bilirubina totală și în orice caz nu depășește 0,2 mg/dl (3.4 μmoli/l).

Studii cromatografice recente au arătat însă că, de fapt, bilirubina conjugată se află în serul normal în cantități mai mici de 4% din biliru-

bina totală, iar reacţia directă obţinută cu astfel de seruri este de fapt un artefact cauzat de citirea întîrziată a extincţiei (reacţia directă întîrziată) sau de prezenţa în ser a unor acceleratori de reacţie. Datorită unor particularităţi ale metabolismului bilirubinei la nou-născut (vezi pag. 260), bilirubina totală poate ajunge, în perioada neonatală, pînă la valori de 5 mg/dl (85 μmoli/l) iar la prematuri poate depăşi 8 mg/dl (136 μmoli/l). Atunci cînd nivelul plasmatic al bilirubinei depăşeşte 2—2,5 mg/dl (34—42,5 μmoli/l) apare coloraţia icterică a tegumentelor.

La electroforeza pe hîrtie a serurilor icterice se constată prezenţa unei coloraţii galbene la nivelul frontului de migrare al albuminelor, indiferent dacă icterul a fost hemolitic (bilirubină neconjugată) sau mecanic (cu predominanţa bilirubinei conjugate). Rezultă deci că ambele tipuri de bilirubină se fixează pe albuminele serice. Stabilitatea legăturii dintre albumină şi pigment este însă mult mai redusă în cazul bilirubinei glicuronoconjugate care este hidrosolubilă şi dializabilă. De altfel, aproximativ 5% din această bilirubină glicuronoconjugată nu se fixează deloc pe albumină. Din acest motiv, o anumită fracţiune a bilirubinei conjugate din ser se elimină pe cale renală printr-un proces de filtrare glomerulară. Sărurile biliare, care cresc împreună cu bilirubina conjugată în cursul icterelor colestatice, accentuează dializabilitatea acesteia şi implicit excreţia ei prin urină. Există, de asemenea, indicii după care alcaloza ar accentua eliminările urinare de bilirubină conjugată, în timp ce acidoza provoacă descreşterea lor. O explicaţie posibilă a fenomenului descris este dată de caracterul anionic al bilirubinei care se fixează pe grupările bazice ale albuminei. Acidoza favorizează disocierea acestor grupări bazice şi contribuie astfel la o mai strînsă legare a bilirubinei de albumină (9).

Pentru diagnosticul de laborator este important de a se preciza că depistarea de pigmenţi (respectiv bilirubină) în urină denotă întotdeauna o creştere a bilirubinei glicuronoconjugate în ser. Tot examenul de urină orientează asupra modificărilor suferite de bilirubină în intestin, respectiv asupra producţiei de urobilinogeni şi a modului în care ficatul asigură captarea şi îndepărtarea urobilinogenilor absorbiţi (vezi pag. 257).

Prin injectarea intravenoasă de bilirubină neconjugată marcată şi urmărirea timpului de înjumătăţire biologică a radioactivităţii în plasmă se pot obţine date cu privire la cinetica metabolismului bilirubinei. S-a putut astfel calcula că, la normali, procesul de clearance al bilirubinei este de 0,5—1 ml/min/kg. Înmulţind această valoare cu concentraţia plasmatică a bilirubinei (mg/ml) se obţin date privind viteza de reîmprospătare (turnover) a pigmentului. La subiecţii normali, valorile medii ale procesului de turnover sînt de 3—3,9 mg/kg/zi. Întrucît aceste valori corespund în mare cu producţia de bilirubină, se poate deduce că un subiect normal de 70 kg produce zilnic aproximativ 200—250 mg bilirubină (4).

Relaţia dintre concentraţia plasmatică de bilirubină neconjugată ($\overline{BR}$), procesul de turnover al acesteia (BRT) şi procesul de clearance (ClBR) poate fi exprimată prin:

$$\overline{BR} \simeq BRT/ClBR$$

Rezultă deci că nivelul plasmatic al bilirubinei neconjugate creşte în caz de accelerare a producţiei sau în condiţiile unui clearance deficitar. Datele experimentale arată însă că în prezenţa unui clearance normal, accelerarea producţiei de bilirubină se însoţeşte de creşteri relativ moderate ale concentraţiei de bilirubină în ser, pe cînd deficitul de clearance are drept urmare o creştere mult mai accentuată a bilirubinei neconjugate. Se poate astfel explica de ce, în cazul

unei hemolize cronice în care producţia de bilirubină poate creşte la 40 mg/kg/zi, nivelul bilirubinemiei depăşeşte rareori 4 mg/dl (vezi pag.263), pe cînd în deficitele de captare şi glicuronoconjugare a bilirubinei, respectiv în cazul unui clearance defectuos, concentraţia bilirubinei neconjugate creşte mult chiar şi în absenţa unei hemolize şi implicit a unei hiperproducţii de pigment (vezi pag. 269).

Dat fiind că cea mai mare parte a bilirubinei provine din hemoliza hematiilor îmbătrînite, s-a încercat calcularea indirectă a valorii de clearance a bilirubinei pe baza determinării timpului de înjumătăţire a eritrocitelor marcate cu ^{51}Cr, obţinîndu-se rezultate comparabile cu cele găsite prin injectarea de bilirubină marcată (4).

V.1.5. PARTICULARITĂȚI ALE METABOLISMULUI BILIRUBINEI LA NOU-NĂSCUT. HIPERBILIRUBINEMIA NEONATALĂ

Bilirubinemia neconjugată formată în macrofagele organismului fetal din hemoproteinele degradate se elimină prin transfer placentar de la făt la mamă. Acest proces este favorizat de concentrația relativ mai scăzută a albuminelor serice în sîngele fetal. Ca urmare, bilirubina tinde să treacă spre circulația maternă mai bogată în albumine capabile să o fixeze și să o transporte spre ficat, unde are loc eliminarea. Acest transfer placentar de bilirubină are o importanță esențială în procesul de depurare a sîngelui fetal, deoarece la făt mecanismele implicate în captarea, glicuronoconjugarea și excreția bilirubinei sînt încă inadecvate necesităților. Deficitele semnalate sînt în măsură să explice așa-zisul „icter fiziologic al noului născut" care survine atunci cînd transferul placentar de bilirubină a fost brusc întrerupt. De fapt, concentrația bilirubinei neconjugate poate ajunge, în primele 24 de ore de la naștere, la valori de 4—5 mg/dl și, uneori, continuă să crească în următoarele 3—4 zile pînă la valori de 10 mg/dl (170 μmoli/l). Mecanismele care asigură procesul de clearance al bilirubinei se maturează apoi destul de rapid, astfel încît, la aproximativ o lună de la naștere, bilirubinemia este doar cu puțin deasupra limitei superioare a normalului. La noul născut prematur, hiperbilirubinemia neonatală este mai accentuată și mai prelungită. În astfel de cazuri, este recomandabil ca nivelul bilirubinemiei să fie explorat zilnic, avîndu-se în vedere că o creștere a bilirubinei neconjugate la valori de peste 20 mg/dl (340 μmoli/l) implică riscul producerii de leziuni ireversibile la nivelul sistemului nervos central, interesînd mai ales nucleii cenușii de la baza creierului (icter nuclear). Pericolul icterului nuclear este deosebit de mare în cazurile de hemoliză brutală cauzată de o incompatibilitate de Rh (eritroblastoză fetală) și însoțită de creșteri excesive ale bilirubinemiei.

Creșteri destul de exprimate și mai ales prelungite ale nivelului seric de bilirubină neconjugată se pot întîlni la noul născut și în lipsa unei hemolize patologice. În unele cazuri, activitatea bilirubinglicuroniltransferazei este inhibată de un steroid (pregnan-3β-20α-diol) prezent în laptele matern. Acest „icter la laptele de mamă" cedează prompt la introducerea alimentației artificiale sau prin schimbarea sursei laptelui de mamă.

Efectele inhibitorii asupra glicuroniltransferazei s-au descris și în urma administrărilor de cloramfenicol, novobiocină sau a dozelor mari de vitamina K.

Hipotiroidismul face ca icterul neonatal să se prelungească timp de săptămîni sau chiar luni. De altfel, o astfel de prelungire a icterului neonatal poate atrage atenția asupra unei insuficiențe tiroidiene a copilului.

Hiperbilirubinemiile excesive (peste 20 mg/dl) și implicit pericolul icterului nuclear survin însă doar în caz de hemoliză excesivă prin incompatibilitatea de Rh sau la imaturi și cu atît mai mult la imaturii la care a survenit o hemoliză prin mecanisme de incompatibilitate. Acțiunea toxică a concentrațiilor excesiv de crescute ale bilirubinei neconjugate este potențată de o permeabilitate crescută a barierei hematoencefalice, de hipoxie și de o hipoalbuminemie precum și de diverși anioni organici (sulfamide, salicilați, acizi grași liberi) care pot disloca pigmentul fixat pe albumina serică. Se știe, de asemenea, că antibioticul novobiocină poate agrava hiperbilirubinemia nou-născuților, inhibînd glicuroniltransferaza. Pe de altă parte, există observații care atestă că, administrîndu-se mamei în cursul travaliului fenobarbital, un binecunoscut inductor de enzime, se stimulează sinteza de glicuroniltransferază și în ficatul fetal, ceea ce duce la diminuarea intensității icterului la noul născut.

Dat fiind riscul de apariție a leziunilor nervoase în cazurile de hiperbilirubinemii excesive (> 20 mg/dl) ale nou-născutului, se recomandă exsanguinotransfuzii, combinate eventual cu infuzii intravenoase de albumină umană care, fixînd bilirubina, o rețin în interiorul vaselor. Întrucît, așa cum s-a mai arătat (vezi pag. 253), expunerea la lumină favorizează transformarea bilirubinei în izomeri care pot fi eliminați chiar și sub formă neconjugată, acest procedeu a fost încercat cu oarecare succes în astfel de cazuri (24).

V.2. SINDROMUL ICTERIC

Icterul poate fi definit ca fiind o colorare anormală gălbuie a pielii și scleroticelor cauzată de o acumulare de pigmenți biliari. De regulă, colorația icterică apare mai rapid și mai intens la nivelul scleroticelor datorită bogăției acestui țesut în elastină care prezintă o afinitate deosebită pentru bilirubină. De notat că o colorație galbenă a tegumentelor dar nu și a scleroticelor poate surveni în caz de carotinemie consecutivă unui consum exagerat de morcovi sau de dovleac galben. Se consideră că icterul devine vizibil atunci cînd bilirubinemia depășește 2—2,5 mg/dl (34—42,5 μmoli/l). De fapt, corelația între bilirubinemie și intensitatea icterului nu este prea strictă. Așa de exemplu, creșterea bilirubinei conjugate produce un icter mai intens decît o aceeași concentrație serică de bilirubină neconjugată. Fenomenul se poate explica prin aceea că bilirubina conjugată, hidrosolubilă și mai labil fixată pe albumină, difuzează cu mai mare ușurință în lichidul interstițial (dar nu și în celule) și se fixează pe fibrele elastice din piele și sclerotice. Această fixare este în măsură să explice și persistența colorației icterice și după ce nivelul bilirubinemiei a revenit spre normal, în cursul procesului de vindecare.

În caz de icter mecanic deosebit de intens, fluidele oculare pot deveni încărcate cu bilirubină conjugată astfel încît bolnavul icteric vede totul într-o nuanță galbenă (xantopsie). Mai frecvent, în astfel de cazuri se ajunge la pigmentarea sudoarei, urinii, laptelui și lichidului spermatic. Atunci cînd icterul mecanic are o evoluție prelungită, și în special în cazurile de obstrucție totală a coledocului printr-un proces malign, colorația tegumentelor poate deveni verzuie, din cauza oxidării bilirubinei spre biliverdină (9, 16, 18, 24).

Pe de altă parte, în cursul unei anemii hemolitice, creșterea, de regulă puțin exprimată, a bilirubinei neconjugate duce la apariția unui icter care survine adeseori pe fondul unei palori a tegumentelor.

Conform celor arătate cu privire la metabolismul bilirubinei, mecanismele care duc la apariția sindromului icteric ar putea fi reprezentate de: o producție excesivă de bilirubină, cauzată de o hemoliză (eventual hemoliză intramedulară); un defect de captare a bilirubinei neconjugate de către hepatocite; un deficit de glicuronoconjugare; o perturbare a procesului de excreție activă a bilirubinei conjugate în canaliculele biliare; o reducere a fluxului biliar apos în căile biliare intrahepatice; o obstrucție a căilor biliare extrahepatice. Intervenția primelor trei mecanisme duce la acumularea de bilirubină neconjugată în timp ce mecanismele 4, 5 și 6 sînt incriminate în creșterea bilirubinei conjugate. Această bilirubină conjugată neeliminată regurgitează sau difuzează din canaliculele biliare în sînge.

O clasificare patogenetică ideală a icterelor ar trebui bazată pe cele șase mecanisme menționate mai sus. Practica clinică arată însă că, de cele mai multe ori, aceste mecanisme sînt intricate. Așa de exemplu, în afecțiunile hepatice (hepatite și ciroze) se asociază defecte de captare, conjugare și mai ales anomalii în procesele de excreție și formare a fluxului biliar apos la care se adaugă fenomene de regurgitare cauzate de o alterare a cordoanelor de hepatocite. În unele cazuri de hepatită cronică sau de ciroză se detectează chiar și o componentă hemolitică.

Pe de altă parte, obstrucțiile prelungite ale căilor biliare produc cu timpul o suferință a hepatocitelor care se repercută într-o oarecare măsură și asupra proceselor de captare și glicuronoconjugare.

Un exemplu deosebit de ilustrativ cu privire la intricarea mecanismelor patogenetice, care duc la creșterea bilirubinemiei, este furnizat de icterul postoperator. De fapt, adeseori după o intervenție chirurgicală majoră (mai ales chirurgie cardiacă sau suturări ale unor anevrisme rupte) se ajunge la icter atît ca urmare a unei hiperproducții de bilirubină, rezultată prin hemoliza sîngelui conservat administrat în mari cantități sau a celui resorbit din hematoame, cît și din cauza unei alterări a funcției hepatice survenite în urma anesteziei, hipotensiunii, a șocului operator sau a unor eventuale stări septice. În cursul intervențiilor pe căile biliare, se poate adăuga lezarea coledocului.

Avîndu-se în vedere dificultățile întîmpinate în clasificarea etiopatogenică a icterelor se recurge la o veche clasificare clinică în ictere hemolitice, ictere hepatocelulare și ictere prin colestază. La aceste tipuri de icter se mai adaugă hiperbilirubinemiile cauzate prin defecte cu caracter genetic în metabolismul bilirubinei.

V.2.1. ICTERELE HEMOLITICE

Accelerarea degradării hemului din hematiile lansate în circulație sau din elementele intramedulare ale eritronului duce la o producție crescută de bilirubină care poate depăși capacitatea ficatului de a capta, glicuronoconjuga și elimina prin bilă pigmentul. Dacă viteza de distrugere a eritrocitelor depășește abilitatea măduvei de a produce noi elemente, apare anemia hemolitică. De precizat că, în caz de stimulare maximală a unei măduve osoase normale, producția de eritrocite poate să crească de 6—8 ori. Există așadar posibilitatea ca durata de viață a hematiilor să scadă de la 120 zile la 20 zile iar cantitatea de hemoglobină degradată zilnic să crească de la 6,7 g la 40 g fără să apară anemia. Se vorbește, în astfel de cazuri, de stări hemolitice compensate, cînd subiectul este mai mult icteric decît anemic. De altfel, nivelul de creștere al bilirubinei serice în icterele hemolitice depășește rareori concentrația de 2—3 mg/dl, chiar atunci cînd producția de bilirubină crește de la valorile normale de 200—250 mg/zi la 1500 mg/zi. Aceasta se datorește marii capacități a ficatului de a depura bilirubina neconjugată. Din motivul amintit, creșteri ale bilirubinemiei indirecte la valori de peste 5 mg/dl, la un bolnav cu icter hemolitic, sugerează intervenția adițională a unei disfuncții hepatice. Așa de exemplu, valorile extrem de ridicate ale bilirubinemiei neconjugate din icterul cauzat de o incompatibilitate de Rh la un nou-născut se datoresc nu numai hemolizei ci și imaturității mecanismelor implicate în procesele de clearance ale bilirubinei (vezi pag. 260).

Întrucît în cursul icterelor hemolitice crește doar bilirubina neconjugată, urina este lipsită de pigmenți biliari (icter acoluric). În schimb, eliminarea excesivă de bilirubină în intestin se însoțește de producerea unor mari cantități de stercobilinogen și, respectiv, stercobilină, astfel încît materiile fecale devin hipercolorate, iar urobilinogenul urinar se pozitivează (18, 24).

Aspectele umorale realizate de icterele hemolitice depind în mare măsură și de viteza hemolizei. Așa de exemplu, în cazul hemolizelor intravasculare brutale se poate depăși marea capacitate a macrofagelor de a transforma hemoglobina în bilirubină, astfel încît se poate ajunge la creșteri trecătoare ale hemoglobinei în plasmă și la hemoglobinurie. În organism, s-au dezvoltat însă o serie de mecanisme care limitează efectul nociv al hemoglobinuriei și, respectiv, precipitarea hemoglobinei în tubii renali, iar pe de altă parte, astfel de mecanisme previn pierderea fierului pe cale urinară.

Așa de exemplu, hemoglobina eliberată în plasmă se combină rapid cu unele glicoproteine serice denumite haptoglobine, complexele formate fiind apoi captate în macrofage și metabolizate, rezultînd, între altele, și bilirubină.

Dacă se depășește capacitatea de combinare a haptoglobinei, o parte din hemoglobina ajunsă în plasmă poate forma și hem oxidat (methem) desprins de pe globină, iar methemul se combină cu hemopexina, o β_1 globulină de 90.000 daltoni, produsă de ficat și aflată în plasmă în concentrații de 50—100 mg/dl. La rîndul lor, complexele methem-hemopexină sînt apoi rapid captate și metabolizate în ficat.

Tabelul 5.1

Clasificarea etiopatogenică a stărilor hemolitice evoluînd cu sau fără anemie și cu icter de intensitate variabilă. Stările hemolitice cu caracter familial se datoresc de cele mai multe ori unui defect intrinsec al eritrocitului (cauze corpusculare), pe cînd cele dobîndite se datoresc unor anomalii extrinseci acționînd asupra unor eritrocite cu structură normală (cauze extracorpusculare). După Wintrobe (26) cu unele modificări.

I. *Moștenite (corpusculare)*	II. *Cîștigate (extracorpusculare)*
A. *Defecte în membrana eritrocitului* (Sferocitoza ereditară, eliptocitoză ereditară, abetalipoproteinemie, deficit de lecitincolesterol aciltransferază, defecte de transfer a fosfolipidelor)	A. *Imunohemolitice* (transfuzii incompatibile, incompatibilitate de Rh, anticorpi la cald, anticorpi la rece.)
B. *Deficite în enzimele cu rol în metabolismul hidraților de carbon* (piruvatkinază, glucozo-6-fosfat dehidrogenază, aldolază, fosfofructokinază, hexokinază, 2—3 difosfogliceromutază)	B. *Prin microtraumatizarea eritrocitelor și microinfarcte* (proteze valvulare și vasculare, purpură trombotică trombocitopenică, coagulare intravasculară diseminată)
C. *Alte deficite enzimatice* (glutation reductază, glutation peroxidază, ATP-ază, adenilkinază)	C. *Prin acțiunea agenților infecțioși* (protozoare, bacterii)
D. *Defecte în structura și sinteza globinei* (Talasemiile, hemoglobinele patologice)	D. *Prin agenți fizici și chimici* (hipertermie, modificări de pH, sulfamide, PAS, anilină, nitrobenzen etc.)

Cînd în urma unei hemolize intravasculare brutale rezultă mari cantități de methem, ce depășesc capacitatea de fixare a hemopexinei, methemul se leagă de albumină, formînd methemalbumina (ferihemalbumină), care imprimă plasmei o culoare brună. Pe măsură însă ce se produc noi cantități de hemopexină, methemalbumina cedează hemul hemopexinei și astfel procesul de îndepărtare a complexelor methem-hemopexină se restabilește, rezultînd noi cantități de bilirubină.

Clasificarea icterelor și respectiv a anemiilor hemolitice se poate face pe criterii de evoluție clinică în acute și cronice, pe baza locului unde are loc hemoliza, respectiv intravascular sau extravascular, sau pe criterii etiopatogenetice (vezi tabel 5.1). Pentru detalii se recomandă consultarea tratatelor de hematologie (26).

Diagnosticul de laborator al icterelor hemolitice se bazează pe trei categorii de modificări: modificări date de distrugerea exagerată a hematiilor; modificări date de răspunsul compensator al măduvei osoase; modificări specifice anumitor tipuri de anemii hemolitice.

Distrugerea în ritm rapid a globulelor roșii se poate măsura fie direct prin constatarea unei reduceri a duratei de viață a hematiilor marcate cu ^{51}Cr, fie indirect prin detectarea unei creșteri a produșilor de degradare a hemului, respectiv creșterea producției de bilirubină și de stercobilinogen. Reamintim că o creștere a producției de bilirubină nu se însoțește întotdeauna de o creștere corespunzătoare a nivelului seric de bilirubină astfel încît, în aproximativ 25% din cazurile cu sferocitoză ereditară și în aproape 40% din cazurile de anemie imunologică, nivelul bilirubinemiei nu depășește 1 mg/dl, iar în restul cazurilor nu se ridică, de regulă, peste 2—3 mg/dl. Un alt indicator al hemolizei este dat de creșterea activității serice a lacticodehidrogenazei (LDH).

De notat însă că, în anemiile hemolitice, nivelul LDH depășește rareori 600 U/l și nu atinge valorile extrem de ridicate întîlnite în anemiile de tip megaloblastic, cînd hemoliza intramedulară afectează mai ales elementele imature ale eritronului. Există indicii că, prin hemoliza eritrocitelor adulte, în anemiile hemolitice, crește mai ales izoenzima LDH_2, pe cînd în anemiile megaloblastice creșterea interesează cu predominanță izoenzima LDH_1. Ca semne indirecte ale hemolizei intravasculare se consideră scăderea haptoglobinelor serice și creșterea eliminărilor urinare de fier (9, 26).

Semne de accelerare compensatorie a eritropoiezei se bazează, în primul rînd, pe constatarea unei *creșteri marcate a reticulocitelor* în sîngele periferic. De notat că, în unele cazuri de anemii imunohemolitice, în care conflictul imun afectează elementele tinere ale eritronului din măduvă, reticulocitoza poate lipsi. Pe de altă parte, în condițiile unei stimulări deosebit de intense a măduvei la noul născut cu icter hemolitic se poate ajunge la apariția de eritroblaști în sîngele periferic.

De multe ori, hemoliza stimulează nu numai eritropoieza dar și producția de leucocite și de plăcuțe sanguine a căror număr crește în sîngele periferic. Există însă și stări hemolitice asociate cu leucopenie și trombocitopenie. O astfel de situație se poate întîlni în hemoglobinuria paroxistică nocturnă, în anemiile hemolitice însoțind un lupus sistemic diseminat și în unele forme de anemii autoimune.

Investigarea frotiurilor, obținute prin puncție medulară, poate furniza indicații suplimentare. De regulă, aspectul este acela al unei hiperplazii eritroide, dar în cazul unei carențe secundare de acid folic se poate ajunge la apariția de elemente macrocitare sau chiar megaloblastice. În astfel de cazuri creșterea nivelului seric al LDH este deosebit de exprimată.

Explorarea ferocineticii evidențiază o accelerare marcată a transportului plasmatic al fierului și o încorporare rapidă a ^{59}Fe în eritrocite.

Modificările specifice anumitor tipuri de anemii permit stabilirea diagnosticului etiopatogenic diferențial. Așa de exemplu, simpla examinare a unui frotiu din sîngele periferic poate depista prezența de sferocite, celule în seceră, schistocite, precum și eventuala infestare cu protozoare.

Detectarea unei fragilități osmotice (rezistență globulară scăzută) este o caracteristică a sferocitozei, pe cînd creșterea rezistenței globulare sugerează o talasemie.

Examinări imunologice (test Coombs, anticorpi la rece) pot preciza natura imunohemolitică, iar determinările de enzime eritrocitare sau de hemoglobine patologice, efectuate în laboratoare specializate, sînt necesare pentru diagnosticul unor anemii hemolitice moștenite (26).

V.2.2. ICTERELE COLESTATICE

Colestaza reprezintă o perturbare a mecanismelor care asigură curgerea bilei și poate surveni începînd de la polul biliar al hepatocitelor și pînă la sfincterul lui Oddi. Este important de precizat că, alături de îngustarea sau obstrucția mecanică a căilor biliare extrahepatice, colestaza

poate avea cauze intrahepatice și are uneori un caracter predominant funcțional. Întrucît formarea fluxului biliar apos depinde în mare măsură de metabolismul acizilor biliari, mecanismele care duc la colestază intrahepatică vor fi mai bine înțelese după expunerea datelor referitoare la biochimia acestor detergenți biologici. Amintim însă că, în timp ce nivelul seric al acizilor biliari crește în toate cazurile de colestază, creșterea bilirubinemiei poate lipsi în fazele inițiale ale colestazei intrahepatice, hiperbilirubinemia devenind evidentă pe măsură ce colestaza se agravează.

Întrucît în cursul colestazei avansate se produce o retenție de bilirubină conjugată, serul bolnavului dă o reacție diazo direct pozitivă, iar urina este intens colurică, conținînd mari cantități de pigmenți biliari. Așa cum s-a arătat, nivelul bilirubinei conjugate este variabil, fiind de multe ori normal în forme ușoare de colestază intrahepatică dar putînd ajunge la valori deosebit de ridicate în formele severe și mai ales în obstrucțiile mecanice. Așa de exemplu, în icterul produs de un calcul înclavat în coledoc, bilirubinemia ajunge la 3—10 mg/dl, pe cînd în procesele neoplazice ale regiunii ampulei lui Vater bilirubina crește progresiv pînă la valori de 15—30 mg/dl. Fiind difuzibilă, bilirubina conjugată trece în lichidul interstițial, se fixează pe fibrele elastice și are tendința de a se oxida spre biliverdină astfel încît, după o evoluție prelungită, icterul capătă o nuanță verzuie.

Este evident că în caz de obstrucție totală a fluxului biliar, așa cum survine în caz de neoplasm de cap de pancreas, bilirubina nu mai ajunge în intenstin și ca urmare nu se formează stercobilinogen și, respectiv, stercobilină. Din acest motiv, materiile fecale devin decolorate iar urobilinogenul nu poate fi detectat în urină. În alte forme de colestază, în care obstrucția nu este totală sau are un caracter intermitent (ca de exemplu în caz de calcul coledocian), culoarea scaunului este variabilă, iar în urină urobilinogenul este adeseori detectabil.

Natura colestatică a unui icter se vădește și prin creșterea marcată a așa-ziselor enzime indicatoare ale colestazei (fosfataza alcalină, γ-glutamiltransferaza, leucinaminopeptidaza, 5-nucleotidaza). Transaminazele pot crește moderat (de regulă, sub 100 U/l) atunci cînd obstrucția căilor biliare se produce brusc (calcul în coledoc și colică biliară), pe cînd în cazul unei stenozări lente (neoplasm de cap de pancreas), transaminazele sînt nemodificate. Pe de altă parte, o obstrucție de lungă durată alterează progresiv parenchimul hepatic astfel încît, după 2—3 luni, nivelul colinesterazei serice, un indicator al sintezei de proteine în ficat, poate scădea pînă la valorile întîlnite în cirozele hepatice decompensate (5, 16, 18, 25). De notat că, spre deosebire de colinesterază, o serie de factori ai coagulării prezintă valori crescute în plasma bolnavilor cu fenomene colestatice și mai ales la cei cu colestază intrahepatică (6).

O altă particularitate a icterelor colestatice și în special a celor cauzate de o obstrucție totală este reprezentată de creșterea lipidelor serice și în special a fosfolipidelor și colesterolului liber care, nefiind eliminate prin bilă, ajung să formeze un complex lipoproteic specific colestazei și denumit lipoproteina X (vezi pag. 246).

Atunci cînd creșterea bilirubinei conjugate nu se însoțește de creșteri ale acizilor biliari și ale enzimelor indicatoare ale colestazei, diagnosticul de colestază se infirmă, iar medicul trebuie să se orienteze spre o anomalie cu caracter genetic în procesul de eliminare a bilirubinei în canaliculele biliare (vezi pag. 271).

V.2.3. ICTERELE HEPATOCELULARE

Sindromul icteric poate apare într-o mare varietate de boli hepatice ca de exemplu în hepatitele acute virale, în cursul puseelor evolutive ale unor hepatite cronice, în hepatopatiile alcoolice și în cirozele hepatice. Aproape întotdeauna apariția icterului la un hepatic este un indiciu de gravitate. Se știe astăzi că leziunile hepatice afectează mai ales eliminarea bilirubinei glicuronoconjugate și formarea fluxului biliar apos și doar în mai mică măsură procesele de captare hepatică și de glicuronoconjugare a pigmentului produs în macrofage. La aceste mecanisme se adaugă comprimarea canaliculelor biliare de către hepatocitele turgescente și a ducturilor biliare din spațiile interlobulare de către edemul inflamator. Totodată, ca urmare a necrozei unor hepatocite, se pot crea comunicări între capilarele sanguine și canaliculele biliare. Modificarea arhitecturii hepatice, cauzată de alternarea proceselor de necroză, scleroză și regenerarea nodulară, caracteristică cirozelor, creează, de asemenea, condiții pentru regurgitarea bilei în capilarele sinusoide.

Ansamblul acestor mecanisme face ca, în icterele hepatocelulare, să crească în sînge atît bilirubina neconjugată cît și cea conjugată, iar în măsura în care crește nivelul acesteia din urmă se ajunge la pozitivarea pigmenților biliari în urină. Datorită scăderii capacității funcționale a hepatocitelor, urobilinogenul absorbit din intestin nu mai este captat și eliminat prin bilă și astfel el apare în urină. De notat însă că, uneori, în cursul hepatitelor virale evoluînd cu icter intens și pronunțate fenomene de colestază, curgerea bilei în intestin este aproape complet sistată, scaunele devin palide iar urobilinogenul dispare din urină. Reapariția urobilinogenului în urina unor astfel de bolnavi coincide cu reluarea fluxului biliar care readuce bilirubina în tractul digestiv și indică o ameliorare a colestazei. Restabilirea funcțiilor hepatice duce la dispariția din urină a pigmenților (bilirubina) și a urobilinogenului.

Precizarea naturii hepatocelulare a unui icter este facilitată de pozitivarea testelor de laborator care indică lezarea celulelor hepatice. Așa de exemplu, pentru hepatita acută pledează creșterea exprimată a aminotransferazelor, iar etiologia acestei afecțiuni poate fi precizată prin evidențierea antigenilor virusali.

Creșterea marcată a γ-globulinelor asociată cu scăderea albuminemiei și a colinesterazei serice la un bolnav icteric atrage atenția asupra cirozei hepatice, iar acizii biliari, fosfataza alcalină și γ-glutamiltransferaza cresc în măsura în care se asociază fenomenele de colestază (16, 25).

Testele utilizate în vederea diagnosticului diferențial al icterelor sînt trecute în mod succint în tabelul 5.2.

Tabelul 6.2

Prezentare schematică a unor date de laborator cu utilitate în diagnosticul diferențial al icterelor

Tipul de icter	*Comportarea pigmenților biliari*			Alte probe de laborator	Observații
	în sînge	în fecale	în urină		
Hemolitic	crește bilirubina neconjugată	hiperpigmentație	pigmenți (bilirubină) negativ; urobilinogen pozitiv	Transaminaze, fosfazata alcalină și γ-GT în limite normale. Fier seric crescut. Durata de viață a hematiilor marcate scăzută. De regulă reticulocitele crescute.	Se efectuează explorări complementare hematologice și imunologice (autoanticorpi) precum și pentru depistarea unor eventuale anomalii ale enzimelor eritrocitare sau de structura hemoglobinei.
Colestatic	crește mai ales bilirubina conjugată	decolorate în caz de obstrucție totală	pigmenți pozitiv; urobilinogen negativ în caz de obstrucție totală	Creșterea exprimată a enzimelor indicatoare ale colestazei (fosfatază alcalină, γ-GT). Creșterea acizilor biliari în sînge. Uneori apariția lipoproteinei X.	Se vor explora căile biliare ecografic în tentativa de a se preciza natura extrahepatică sau intrahepatică a colestazei.
Hepatocelular	crește atît bilirubina conjugată cît și cea neconjugată	parțial decolorate în cazurile cu caracter colestatic	pigmenți pozitiv; urobilinogen variabil	Variază în funcție de forma clinică. De ex. în hepatita acută creșterea exprimată a transaminazelor; în cirozele decompensate scăderea colinesterazei serice.	Apariția icterului la un hepatic reprezintă un indiciu de gravitate. Se vor face investigații pentru a se preciza natura hepatopatiei (virală, alcoolică).

V.2.4. HIPERBILIRUBINEMII PRIN DEFECTE GENETICE ÎN METABOLISMUL BILIRUBINEI

Aceste anomalii survin relativ rar dar au o importanță teoretică deosebită deoarece mecanismele implicate în producerea icterului se limitează de regulă la un singur defect de metabolism al bilirubinei, astfel încît studiul lor a contribuit în mare măsură la descifrarea fiziopatologiei icterelor. Un criteriu simplu de clasificare a hiperbilirubinemiei se bazează pe caracterul conjugat sau neconjugat al pigmentului reținut. Creșterea bilirubinei neconjugate constituie astfel caracteristica comună întîlnită în sindromul Gilbert și în deficitele de glicuronoconjugare (forma severă tip I sau sindromul Crigler-Najjar și forma moderată tip II cunoscută și sub denumirea de sindrom Arias).

Pe de altă parte, retenția de bilirubină conjugată survine în sindromul Doubin-Johnson, în sindromul Rotor și în sindromul stocării hepatice (hepatic storage syndrome). Particularitățile clinice și de laborator, precum și mecanismele patogenice ale acestor anomalii sînt descrise în continuare.

V.2.4.1. SINDROMUL GILBERT

Esența anomaliei este reprezentată de o întîrziere în captarea și procesul de clearance al bilirubinei neconjugate. S-a considerat (24) că diagnosticul de sindrom Gilbert poate fi stabilit doar atunci cînd sînt îndeplinite următoarele criterii: creșterea moderată dar cronică a bilirubinei conjugate; eritropoieză și reticulocite în limite normale; durata de viață a eritrocitelor normală; lipsa anomaliilor morfologice la nivelul ficatului și căilor biliare; teste funcționale hepatice normale; acizi biliari serici în limite normale.

Observații clinice și de laborator mai recente au putut evidenția însă existența unor subiecți cu sindrom Gilbert la care defectul de clearance al bilirubinei se asociază cu fenomene fruste de hemoliză. Deși are un caracter familial, mecanismul de transmitere al anomaliei este neclar, iar icterul se evidențiază, de regulă, după vîrsta de 20 de ani. Bilirubinemia este moderat crescută (de regulă, sub 3 mg/dl respectiv 51 μmoli/l), dar se accentuează după un post prelungit, febră sau infecții, efort excesiv precum și după consumul de alcool.

Nivelul crescut al bilirubinemiei nu se însoțește însă de vreo acuză subiectivă iar subiecții afectați de această anomalie sînt depistați cu ocazia unui examen de laborator determinat de colorația subicterică care sugerează o posibilă afecțiune hepatică. Recunoașterea anomaliei care, prin caracterul său benign, nu necesită nici un tratament, prezintă totuși o importanță practică spre a-i liniști pe subiecții afectați care ajung să fie obsedați de gîndul că suferă de o hepatită cronică.

Mecanismele intime prin care se ajunge la deficitul de clearance al bilirubinei neconjugate nu sînt încă pe deplin elucidate. Deși bila conține bilirubină conjugată, aceasta prezintă o proporție crescută de monoglicuronid denotînd o oarecare încetinire a glicuronoconjugării, iar activitatea bilirubinglicuroniltransferazei, măsurată în materialul obținut

prin puncție biopsie hepatică, este de fapt mai redusă decît la subiecții normali. Alături de un astfel de defect minor, în procesul de glicuronoconjugare se incriminează și un defect de captare a bilirubinei de către hepatocite, explicabil printr-o reducere a conținutului de ligandine din citosolul și membrana celulelor hepatice. De menționat că administrarea de fenobarbital cu efect inductor ameliorează procesul de clearance al bilirubinei și reduce nivelul seric crescut al acestui pigment (4, 16, 24).

V.2.4.2. SINDROMUL CRIGLER-NAJJAR

Alterarea severă a procesului de glicuronoconjugare și de eliminare din plasmă a bilirubinei duce la o hiperbilirubinemie neconjugată extrem de accentuată cu posibile implicații nocive asupra sistemului nervos central. Astfel de cazuri de icter nehemolitic familial au fost descrise de Crigler și Najjar în 1972. Spre deosebire de sindromul Gilbert, în sindromul Crigler-Najjar nivelul bilirubinei neconjugate poate atinge valori de 15—48 mg/dl (255—316 μmoli/l). Întrucît, așa cum s-a arătat (vezi pag. 255) bilirubina neconjugată liposolubilă poate pătrunde prin membranele lipoide ale celulelor, o astfel de hiperbilirubinemie duce la lezarea neuronilor din scoarța cerebrală și cerebel precum și din nucleii bazali, realizînd așa-zisul icter nuclear. O bună parte a nou-născuților homozigoți cu această anomalie sucombă încă din primele 15 luni de viață. La homozigoții care supraviețuiesc, nivelul bilirubinemiei se stabilizează la valori de 15—25 mg/dl, iar manifestările neurologice capătă un caracter cronic manifestîndu-se mai ales prin ataxie.

Există astăzi suficiente dovezi care atestă că această anomalie, cu caracter familial autosomal recesiv, este cauzată de un deficit sever al procesului de glicuronoconjugare. De fapt, bila homozigoților are o culoare galben deschisă și conține doar mici cantități de bilirubină care este neconjugată, iar cercetări efectuate pe fragmente de țesut hepatic, prelevate prin biopsie, confirmă absența procesului de glicuronoconjugare a bilirubinei precum și a altor substanțe cum sînt mentolul și salicilații și care, în mod normal, se elimină sub formă de glicuronoconjugați.

Defectul de glicuronoconjugare și de eliminare prin bilă a bilirubinei este doar parțial compensat prin alte mecanisme. Așa de exemplu mici cantități de bilirubină neconjugată se pot elimina prin mucoasa intestinală, pigmentul fiind apoi degradat spre compușii hidrosolubili diazonegativi. O altă cale alternativă de degradare a bilirubinei are loc în piele, procesul fiind stimulat de expunerea la lumină. De altfel, fototerapia, respectiv expunerea bolnavilor la o lumină puternică (arc voltaic), constituie, la ora actuală, principalul mijloc prin care se poate încerca o reducere a bilirubinemiei la astfel de subiecți.

Așa cum era de așteptat, heterozigoții au o capacitate de glicuronoconjugare de aproximativ 50% din valorile normale, care însă este suficientă pentru a preveni instalarea hiperbilirubinemiei (4, 16, 24).

V.2.4.3. DEFECTUL FAMILIAL MODERAT DE GLICURONOCONJUGARE

Cunoscută și sub denumirile de sindrom Arias sau de sindrom Crigler-Najjar tip II, această anomalie cu caracter familial are un mecanism de transmitere autosomal dominant cu penetranță variabilă, spre deosebire de sindromul Crigler-Najjar tip I, nivelul bilirubinei neconjugate nu depășește 20 mg/dl (340 μmoli/l) situîndu-se, de regulă, între 6—20 mg/dl (102—340 μmoli/l), iar fenomenele neurologice lipsesc.

De asemenea, bila este pigmentată și conține cantități apreciabile de bilirubină conjugată. În fragmentele de țesut hepatic, activitatea bilirubinglicuroniltransferazei este mult redusă dar nu complet absentă. Această activitate enzimatică crește însă după administrarea de fenobarbital, denotînd caracterul inductibil al enzimei, iar nivelul bilirubinemiei scade după o astfel de medicație.

De notat însă că homozigoții cu sindrom Crigler-Najjar tip I nu răspund la acțiunea inductoare a fenobarbitalului. Particularitățile diverselor anomalii cu caracter familial în procesele de captare și glicuronoconjugare a bilirubinei sînt sistematizate în tabelul 5.3.

V.2.4.4. ANOMALII GENETICE EVOLUÎND CU CREȘTEREA BILIRUBINEI CONJUGATE (SINDROMUL DUBIN-JOHNSON, SINDROMUL ROTOR ȘI SINDROMUL STOCĂRII HEPATICE)

La baza tuturor acestor sindroame stă un deficit al mecanismelor care asigură eliminarea bilirubinei glicuronoconjugate din hepatocite în canaliculele biliare. În toate sindroamele amintite creșterea bilirubinei conjugate în ser se asociază cu o apariție a bilirubinei în urină (icter coluric), manifestările clinice sînt puțin exprimate sau chiar absente, iar nivelul seric al acizilor biliari, activitatea enzimelor indicatoare ale colestazei (γGT, fosfatază alcalină) precum și alte teste uzuale de explorare a ficatului sînt în limite normale.

Pe de altă parte, sindroamele amintite diferă între ele printr-o serie de particularități biochimice și funcționale.

În *sindromul Dubin-Johnson,* nivelul seric a bilirubinei conjugate este de 2—5 mg/dl putînd crește uneori pînă la 15 mg/dl (255 μmoli/l), pigmentul găsindu-se aproape în întregime sub formă de diglicuronid. O particularitate importantă a acestui sindrom constă din incapacitatea de a elimina în bilă diverși „anioni colefilici“, așa cum sînt substanțele iodate de contrast utilizate pentru opacifierea căilor biliare, iar ca urmare, colecistografiile și, în general, colangiografiile sînt negative.

Deosebită este și comportarea testului cu bromsulfonftaleină (BSP). Astfel, după 45 minute de la injectare, retenția de colorant este la limita superioară a normalului sau doar moderat crescută (de regulă <15%) dar, ulterior, după 90—120 minute de la injectare, se constată o „reîntoarcere“ a colorantului în plasmă. S-a putut preciza că, deși procesul de captare și de stocare hepatică a colorantului, precum și glicuronoconjugarea lui decurg în mod normal, traversarea hepatică și respectiv eliminarea pe cale biliară a BSP-ului glicuronoconjugat este perturbată. Ca urmare, are loc un reflux în sînge a colorantului glicuronoconjugat stocat în ficat și neeliminat prin bilă, fapt care explică

Tabelul 5.3

Prezentare schematică a mecanismelor patogenice şi a unor particularităţi clinice şi de laborator în anomaliile genetice evoluind cu creşterea bilibubinei neconjugate. În toate aceste cazuri pigmenţii biliari nu apar în urină, probele hepatice sînt normale iar procesul de clearance al bilirubinei este deficitar.

	Modul pe transmitere genetică şi vîrsta la care apare	Nivelul bilirubinei neconjugate în ser	Aspectul bilei	Activitatea de conjugare a bilirubinei	Răspuns la fenobarbital	Alte particularităţi
Sindromul Gilbert	Neclar Apare de regulă după 20 de ani	1—6 mg/dl (17—102 µmoli/l)	Normal pigmentată, bilirubina conjugată prezentă dar procentul de monoglicuronid este crescut	Moderat scăzută	prezent	— La deficitul moderat de glicuronoconjugare se asociază un deficit de ligandine — Nivelul bilirubinei serice creşte după un post prelungit — Există şi cazuri cu fenomene fruste de hemoliză
Sindrom Crigler—Najjar tip I	autosomal recesiv de regulă părinţii sînt consanguini; apare încă de la naştere	15—40 mg/dl de regulă peste 20 mg/dl (>340 µmoli/l)	palidă, lipsită de bilirubină conjugată	absentă	absent	Se asociază cu leziuni ale neuronilor (icter nuclear)
Sindrom Arias (Crigler—Najjar tip II)	autosomal dominant cu penetranţa variabilă; apare de la naştere	6—20 mg/dl (102—340 µmoli/l)	normal pigmentată, procentul de bilirubină monoglicuronid evident crescut	mult scăzută	prezent	Fără manifestări neurologice sau vreun alt corespondent clinic

creşterea secundară a concentraţiei plasmatice de BSP, care se elimină apoi prin urină.

În mod surprinzător, coloranţii care sînt depuraţi de ficat fără o prealabilă glicuronoconjugare (de exemplu verdele de indocianină) nu dau o creştere secundară a concentraţiei lor în plasmă.

Deşi nivelul plasmatic al acizilor biliari nu este anormal crescut, testele de încărcare cu acizi biliari (acid ursodeoxicolic) denotă o moderată reducere a proceselor de captare şi de clearance a acestor anioni organici.

De notat că toate anomaliile mecanismelor care asigură traversarea hepatică a anionilor colefilici se accentuează în urma administrării de anticoncepţionale steroidice orale.

O anomalie care poate fi cu greu conectată la cele expuse constă din eliminarea prin urină a coproporfirinei I (spre deosebire de subiecţii normali care excretă mici cantităţi de coproporfirină tip III). Aspectul macroscopic al ficatului, observat la laparoscopie, este caracteristic avînd o culoare neagră iar examenul microscopic evidenţiază un pigment de culoare închisă localizat mai ales centrolobular şi avînd afinitate pentru unii coloranţi ai grăsimilor (Negru-Sudan şi Oil-Red dar nu şi Sudan IV).

Sindromul Rotor, evoluînd cu o creştere a bilirubinei directe la valori similare cu cele găsite în sindromul Dubin-Johnson, diferă de acesta prin aspectul normal al ficatului, prin colangiografia pozitivă, prin procentul mai redus de coproporfirină I eliminată prin urină şi prin creşterea procentului de bilirubină serică conjugată sub formă de monoglicuronid.

Testul cu BSP indică o retenţie a colorantului de peste 25%, la 45 minute de la injectare, fără să apară însă o creştere secundară după 90—120 minute. Se consideră că atît în acest sindrom cît şi în mai puţin definitul *sindrom al stocării hepatice* ar exista nu atît un defect în faza finală de eliminare a bilirubinei şi BSP-ului cît mai ales o perturbare a proceselor de stocare (4, 18). Redăm sinoptic în tabelul 5.4. datele principale referitoare la anomaliile genetice evoluînd cu creşterea nivelului seric al bilirubinei conjugate.

V.3. ACIZII BILIARI

V.3.1. DATE GENERALE

Din punct de vedere chimic, acizii biliari pot fi definiţi ca fiind acizi carboxilici conţinînd de regulă 24 atomi de carbon. Toţi acizii biliari au o structură ciclopentanoperhidrofenantrenică (similară colesterolului din care derivă), iar gruparea carboxilică se află la capătul lanţului lateral (vezi fig. 5.4.). Acizii biliari naturali sînt hidroxilaţi, conţinînd una, două sau trei grupări hidroxil, în poziţiile 3, 7 sau 12, şi sînt excretaţi în duoden sub formă conjugată fie cu glicocolul fie cu taurina. Acizii biliari sintetizaţi în ficat pe seama colesterolului se numesc *acizii biliari primari* şi sînt reprezentaţi de acidul colic trihidroxilat (acid 3α, 7α,

Tabelul 5.4

Prezentare schematică a mecanismelor patogenice și a unor particularități metabolice în anomaliile genetice evoluînd cu creșterea bilirubinei conjugate. În toate aceste cazuri, pigmenții biliari apar în urină iar probele hepatice uzuale, enzimele indicatoare ale colestazei și nivelul acizilor biliari sînt în limite normale.

	Modul de transmitere genetică	Nivelul bilirubinei conjugate în ser	Colecistografia	Testul cu BSP	Mecanism patogenic	Alte particularități
Sindrom Dubin—Johnson	autosomal recesiv	2—5 mg/dl; uneori pînă la 15 mg/dl; sub formă de diglicuronid	negativă	Retenția moderată ($<15\%$) la 45 min.; creștere secundară la 90—120 min.	Defect de eliminare în bilă a anionilor colefilici	— Ficat încărcat cu un pigment de culoare închisă — Eliminare prin urină a coproporfirinei I ($>80\%$ din totalul eliminării urinare de coproporfirină)
Sindrom Rotor	autosomal recesiv	2—5 mg/dl; uneori pînă la 15 mg/dl; predomină monoglicuronidul	pozitivă	Retenția de peste 25% la 45 min. dar fără creștere secundară	Predomină defectul de stocare	Ficat de aspect normal coproporf. I$<80\%$ din totalul coproporfirinelor urinare
Sindromul stocării hepatice	necunoscut	2—7 mg/dl; predomină monoglicuronidul	Se vizualizează cu o întîrziere de pînă la 20 ore	Retenție de aprox. 36%; fără creștere secundară	Deficit sever de stocare	Ficat de aspect normal Eliminarea de coproporfirine nestudiată

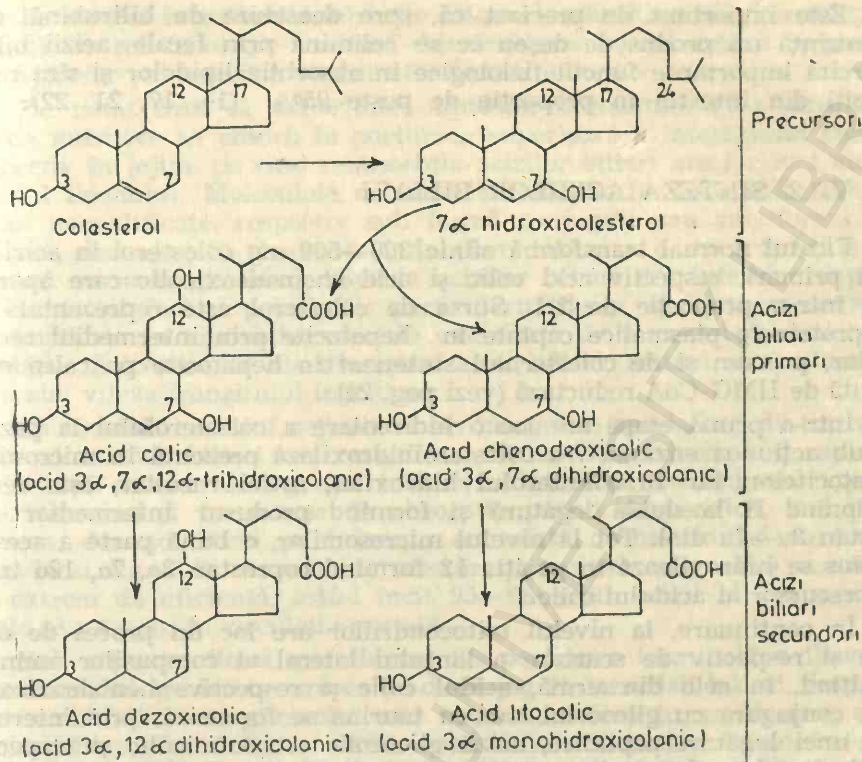


Fig. 5.4. Structura acizilor biliari primari și secundari precum și a precursorilor. Se poate vedea că transformarea colesterolului cu 27 atomi de carbon în acizi biliari cu 24 de atomi de carbon implică hidroxilări ale nucleului ciclopentanoperhidrofenantrenic și scurtarea catenei laterale care pierde trei carboni și este carboxilată la poziția 24. De notat că hidroxilii și carboxilul sînt grupări polare care asigură o bună solubilitate în apă a acizilor biliari.

12α trihidroxicolanic) și acid chenodeoxicolic dihidroxilat (acid 3α, 7α dihidroxicolanic).

Cînd acești acizi biliari primari suferă un proces de 7α — dehidroxilare sub acțiunea enzimelor florei microbiene din intestin, ei se transformă în *acizi biliari secundari*, respectiv acid deoxicolic (acid 3α, 12α dihidroxicolanic), provenit din acidul colic, și acid litocolic (acid 3α monohidroxicolanic) provenit din acidul chenodeoxicolic. De notat că acizii biliari sînt cu atît mai hidrosolubili cu cît au mai multe grupări hidroxil. Așa de exemplu, acidul litocolic, produs de altfel într-o cantitate foarte redusă, are o mare tendință de a precipita fixîndu-se pe resturile vegetale din intestin și eliminîndu-se cu materiile fecale.

În ultimii ani s-au descris și așa-zișii acizi biliari terțiari derivați prin transformare la nivel hepatic a unor metaboliți ai acizilor biliari reabsorbiți din intestin. Așa este de exemplu acidul ursodeoxicolic format prin reducerea în hepatocite a unui metabolit colonic, acidul 7-cetolitocolic, care devine astfel dihidroxilat în pozițiile 3 și 7 și apare ca un stereoizomer al acidului chenodeoxicolic.

Este important de precizat că, spre deosebire de bilirubină, care reprezintă un produs de deșeu ce se elimină prin fecale, acizii biliari exercită importante funcții fiziologice în absorbția lipidelor și sînt reabsorbiți din intestin în proporție de peste 95% (14, 17, 21, 22).

V.3.2. SINTEZA ACIZILOR BILIARI

Ficatul normal transformă zilnic 300—500 mg colesterol în acizi biliari primari, respectiv acid colic și acid chemodeoxicolic care apar în bilă într-o proporție de 2:1. Sursa de colesterol este reprezentată de lipoproteinele plasmatice captate în hepatocite prin intermediul receptorilor, precum și de colesterolul sintetizat în hepatocite pe calea controlată de HMG-CoA reductază (vezi pag. 24).

Într-o primă etapă are loc o hidroxilare a colesterolului la poziția 7, sub acțiunea enzimei 7-α colesterolhidroxilază prezentă în microsomii hepatocitelor, iar 7α colesterolul hidroxilat, astfel rezultat, este redus adiționînd H la dubla legătură și formînd produsul intermediar coprostan 3α—7α diol. Tot la nivelul microsomilor, o bună parte a acestui produs se hidroxilează în poziția 12 formînd coprostan 3α, 7α, 12α triol, un precursor al acidului colic.

În continuare, la nivelul mitocondriilor are loc un proces de oxidare și respectiv de scurtare a lanțului lateral al compușilor amintiți rezultînd, în cele din urmă, acidul colic și respectiv chenodeoxicolic. Prin conjugare cu glicocolul sau cu taurina se formează, prin intermediul unei legături peptidice, acizii glicocolic sau taurocolic și respectiv acizii glicochenodeoxicolic sau taurochenodeoxicolic. Reglarea sintezei de acizi biliari se face în funcție de reabsorbția acestora din intestin și este mai bine înțeleasă după prezentarea datelor privind circuitul enterohepatic (14, 17, 21).

V.3.3. CIRCUITUL ENTEROHEPATIC AL ACIZILOR BILIARI

Acizii colic și chenodeoxicolic sintetizați în hepatocite sînt deversați în canaliculele biliare printr-un mecanism de transport activ mediat, se pare, de către o proteină transportoare și independent de secreția bilirubinei și a altor anioni organici. Pe de altă parte, creșterea presiunii osmotice în canaliculele biliare, cauzată de acumularea de acizi biliari astfel secretați, atrage apa în aceste canalicule și reprezintă principala forță motrice în generarea fluxului biliar apos. Ajunși în bilă, acizii biliari formează micelii, respectiv agregate coloidale în asociere cu colesterolul și fosfolipidele. Sub această formă, acizii biliari sînt deversați împreună cu bila în duoden. De notat însă că, pe parcurs, bila se concentrează în vezica biliară de aproximativ 5—10 ori. Conținutul vezicii biliare este expulzat în duoden în urma ingestiei de alimente cu efect colagog astfel încît, la aproximativ 30 minute de la un astfel de prînz, se poate constata o creștere bruscă a concentrației de acizi biliari în duoden.

La nivelul intestinului, sărurile biliare tensioactive își exercită principalul lor rol fiziologic constînd din facilitarea emulsionării și absorbției lipidelor și implicit a vitaminelor liposolubile.

De notat însă că majoritatea lipidelor alimentare și a altor substanțe nutritive se absorb în porțiunea superioară a intestinului subțire, respectiv în jejun, pe cînd reabsorbția acizilor biliari are loc mai ales la nivelul ileonului. Moleculele de acizi biliari pot fi reabsorbite din intestin nemodificate, respectiv sub formă conjugată sau sub formă modificată, deconjugată și eventual dehidroxilată, iar o mică fracțiune se elimină cu materiile fecale. Soarta acizilor biliari din intestin depinde de următorii factori principali: particularitățile și eficiența mecanismelor implicate în absorbție; efectele exercitate de flora microbiană; proprietățile fizicochimice ale diverșilor acizi biliari, resturi alimentare nedigerate; viteza tranzitului intestinal.

La nivelul ileonului acționează un mecanism specializat de transport activ al acizilor biliari care asigură o reabsorbție selectivă și rapidă a majorității acestor detergenți biologici. Alături de mecanismul specific mai intervine și un proces de absorbție pasivă nespecifică, mai puțin eficient, dar acționînd pe întreaga suprafață a intestinului subțire și gros (vezi fig. 5.3). Ansamblul acestor mecanisme asigură o reabsorbție extrem de eficientă, astfel încît 95—98% din acizii biliari secretați zilnic se reîntorc în circulația portală.

Sub acțiunea florei microbiene din porțiunea terminală a ileonului și a colonului are loc un proces de deconjugare iar acizii biliari, desprinși din combinațiile cu glicocolul sau taurina, suferă în continuare o 7α dehidroxilare, formîndu-se astfel acizii biliari secundari. Acidul deoxicolic dihidroxilat se reabsoarbe în circulația portală împreună cu acidul colic și chenodeoxicolic, în timp ce acidul litocolic monohidroxilat, avînd o solubilitate redusă, tinde să precipite și se fixează pe suprafața reziduulor vegetale nedigerate.

Fibrele vegetale joacă de altfel un rol important în economia acizilor biliari din intestin. În primul rînd, un anumit procent de acizi biliari (și nu doar acidul litocolic) se fixează pe aceste fibre vegetale; în al doilea rînd o alimentație bogată în reziduuri vegetale nedigerabile accentuează motilitatea intestinală. Ca urmare, subiecții care consumă o dietă bogată în fibre vegetale (varză, fasole, pîine integrală), precum și cei cu un tranzit intestinal accelerat excretă o cantitate sporită de acizi biliari prin fecale. Oricum, chiar și în prezența unei reabsorbții optime din intestin, o cantitate de 300—700 mg acizi biliari se elimină zilnic prin fecale, această cantitate fiind înlocuită prin sinteză hepatică.

Acizii biliari absorbiți din intestin și trecuți în circulația portală sînt rapid captați la nivelul ficatului, astfel încît doar cantități infime scapă prin venele suprahepatice în circulația sistemică.

Se știe astăzi că hepatocitele sînt prevăzute cu receptori membranali specifici care asigură o extracție extrem de eficientă a acizilor biliari din capilarele sinusoidale. Există dovezi că acizii biliari trihidroxilați și mai ales cei conjugați (respectiv acizii glicocolic și taurocolic) se captează mai rapid decît cei dihidroxilați și neconjugați. Acizii biliari astfel captați în hepatocite sînt apoi deversați în canaliculele bi-

liare împreună cu cei nou sintetizaţi în ficat prin mecanismul de transport activ amintit la începutul subcapitolului. Totodată, acizii biliari absorbiţi din intestin şi captaţi în ficat reglează, printr-un mecanism de feed-back negativ, sinteza hepatică a acestor detergenţi biologici (1, 22).

V.3.4. REGLAREA SINTEZEI DE ACIZI BILIARI

Sinteza de acizi biliari are rolul de a compensa pierderile. Există dovezi că această sinteză se accelerează ori de cîte ori se accentuează pierderile. Aşa de exemplu, sinteza de acizi biliari creşte după drenajul bilei sau după administrarea de colestiramină (Questran[R], Cuemid[R]), o răşină care fixează în intestin acizii biliari sub formă neabsorbabilă. Pe de altă parte, inaniţia şi implicit reducerea secreţiei biliare şi a motilităţii intestinale se însoţeşte de o scădere a sintezei de acizi biliari.

Controlul sintezei de acizi biliari se exercită prin intermediul enzimelor cheie ale sintezei de colesterol şi de acizi biliari. De fapt, cercetări *in vitro* au demonstrat că atît activitatea HMG-CoA reductazei cît şi cea a colesterol 7α hidroxilazei cresc în microsomii izolaţi din ficatul şobolanilor care, înainte de sacrificare, fuseseră trataţi cu colestiramină. Dimpotrivă, inaniţia şi administrarea de acizi biliari deprimă activitatea ambelor enzime. Pe de altă parte, administrarea alimentară de colesterol duce la scăderea activităţii HMG-CoA reductazei dar amplifică activitatea 7-α hidroxilazei, iar tomatina, un glicozid steroidic, care inhibă absorbţia colesterolului dar nu şi pe cea a acizilor biliari, creşte activitatea HMG-CoA reductazei dar nu are efect asupra 7 α hidroxilazei. Aceste date prezentate sintetic în fig. 5.5 şi tabelul 5.5 subliniază legătura funcţională între sinteza hepatică de colesterol şi de acizi biliari, arătînd totodată că cele două procese enzimatice pot fi reglate şi în mod independent (21).

Întrucît creşterile reactive de HMG-CoA reductază şi colesterol 7 α-hidroxilază nu mai survin la animalele la care sinteza de proteine a

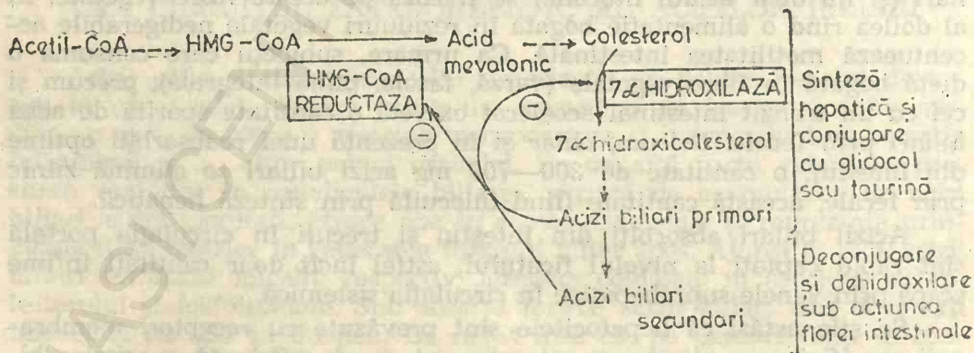


Fig. 5.5. Reglarea sintezei de acizi biliari cuplată cu reglarea sintezei de colesterol se manifestă prin efectul de represie exercitat de acizii biliari primari şi secundari asupra enzimelor HMG-CoA-reductază şi α-colesterol hidroxilază. Semnul ⊖ indică represia enzimelor (feed-back negativ). De notat că acidul deoxicolic inhibă cu precădere sinteza acidului chenodeoxicolic.

Tabelul 5.5

Efectul diferitelor procedee experimentale asupra activității HMG–CoA reductazei și colesterol 7 α–hidroxilazei.

	Administrare de colestiramină sau drenaj biliar	Inaniție	Administrare de colesterol	Administrare de acizi biliari	Fenobarbital	Tomatină	Cortisol	Tiroxină
HMG-CoA reductaza	crește	scade	scade	scade	crește	crește	crește	crește lent
Colesterol-7α-hidroxilaza	crește	scade	crește	scade	crește	nemodificată	crește	crește rapid

fost inhibată cu cicloheximidă, se consideră că modificarea acestor enzime hepatice este un rezultat al inducerii, adică al sintezei de noi molecule de enzime, ca răspuns la diverși agenți inductori (sau mai degrabă un efect al derepresiei ca răspuns la absența din mediu a unui corepresor care, în cazul de față, este reprezentat de produsul final al reacțiilor catalizate de lanțul enzimatic, respectiv de înșiși acizii biliari).

O dovadă indirectă privind inductibilitatea HMG-CoA reductazei și 7 α hidroxilazei este furnizată de observațiile privind creșterea activității ambelor enzime după administrarea de fenobarbital, un bine cunoscut agent inductor. Enzimele amintite sînt supuse și unei reglări hormonale. Așa de exemplu, tiroidectomia duce la o scădere a 7 α colesterol hidroxilazei și, implicit, la o încetinire a producerii de acizi biliari pe seama colesterolului, în timp ce administrarea de tiroxină induce enzima amintită și potențează efectul stimulant al depleției de acizi biliari consecutivă administrării de colestiramină. Sinteza de acizi biliari este stimulată de hormonii glicocorticoizi și este deprimată după suprarenalectomie (vezi tabel 5.5 și fig. 5.5).

V.3.5. ASPECTE CANTITATIVE ALE CIRCULAȚIEI ENTEROHEPATICE

(Noțiunile de secreție, sinteză și rezervor de acizi biliari)

Pentru o mai bună înțelegere a variațiilor patologice survenite în metabolismul acizilor biliari considerăm necesară precizarea următoarelor noțiuni.

Rezervorul de acizi biliari poate fi definit ca fiind cantitatea de acizi biliari existenți în organism sau mai precis în circulația enterohepatică (ficat, căile biliare, intestin și circulația portală). Acest rezervor (sau capital) de acizi biliari este circulat de mai multe ori în cursul zilei. Evaluarea rezervorului de acizi biliari se poate efectua prin metoda diluției izotopice ba-

zată pe adminstrarea unei cantități cunoscute de acizi biliari marcați (de exemplu, ^{14}C acid colic sau ^{3}H chenodeoxicolic). Se determină apoi activitatea specifică a acizilor biliari, adică raportul dintre acizii biliari radioactivi și cei neradioactivi și care variază invers proporțional cu totalul de acizi biliari existenți, respectiv cu mărimea rezervorului. Pe baza datelor recente valorile rezervorului de acizi biliari ar oscila între 2 și 4 g (14, 15, 22).

Numărul de cicluri enterohepatice pe 24 de ore se referă la frecvența golirii vezicii biliare și a reabsorbției acizilor biliari deversați în intestin. Numărul de cicluri enterohepatice și implicit viteza de circulație a capitalului (rezervorului) de acizi biliari depinde de frecvența și felul alimentației. Se consideră astfel că rezervorul de acizi biliari este circulat de cel puțin trei ori în cursul zilei în legătură cu cele trei mese principale. Cercetări recente sugerează însă că, la fiecare act alimentar, rezervorul de acizi biliari este recirculat de două ori, ceea ce implică 6 cicluri/zi (14).

Secreția de acizi biliari reprezintă cantitatea totală de acizi biliari care trece prin canalul coledoc în decurs de 24 de ore. Această cantitate constă, în primul rînd, din acizii biliari reabsorbiți din intestin și resecretați în bilă, la care se adaugă acizii biliari produși prin sinteză hepatică „de novo". În condiții de echilibru, secreția zilnică de acizi biliari este egală cu produsul între valoarea rezervorului de acizi biliari și numărul de cicluri enterohepatice.

Sinteza de acizi biliari reprezintă doar o fracțiune a secreției și este menită să înlocuiască pierderile fecale. În condiții de echilibru, sinteza de acizi biliari este egală cu pierderea fecală și oscilează între 300—700 mg/zi.

Pentru înțelegerea noțiunilor de mai sus considerăm utilă prezentarea unei exemplificări numerice. Astfel un subiect prezentînd un rezervor (capital) de acizi biliari de 3000 mg, pe care îl recirculează de 6 ori (în cursul meselor principale) are o secreție de 18.000 mg acizi biliari/zi. Din această cantitate doar 500 mg acizi biliari se pierde zilnic prin fecale și este înlocuită prin sinteză „de novo". În consecință, sinteza de acizi biliari reprezintă doar 16,6% din capitalul de acizi biliari și abia 2,8% din secreția totală de acizi biliari.

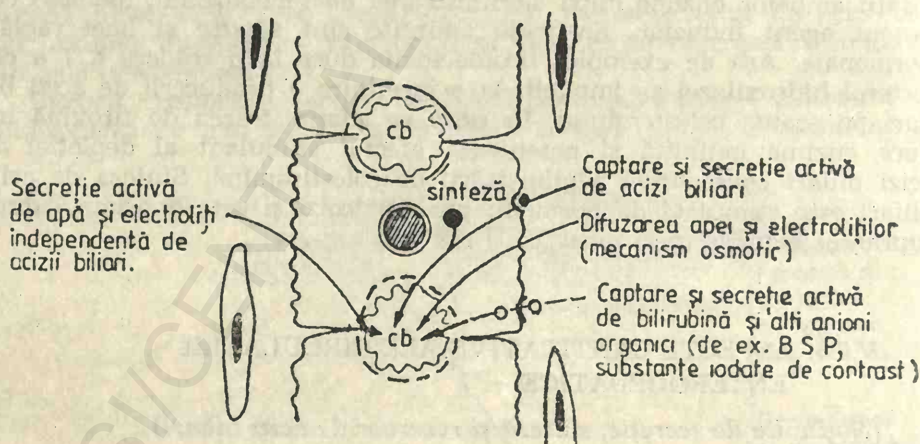


Fig. 5.6. Mecanismul de formare a fluxului biliar apos. Acizii biliari captați de către hepatocite din circulația portală sau sintetizați în ficat se secretă activ, în canaliculele biliare (c.b.) și atrag, prin mecanism osmotic, un flux de apă și electroliți. Un astfel de flux se poate forma însă și printr-un mecanism energodependent și independent de acizii biliari. De notat că secreția de bilirubină și de BSP se face prin alte mecanisme (și respectiv prin intervenția altor proteine transportoare) decît cele implicate în secreția de acizi biliari. Curgerea bilei și implicit drenarea tuturor substanțelor secretate în canaliculele biliare depind însă în ultimă instanță de asigurarea unui flux biliar apos adecvat.

V.3.6. FUNCȚIILE FIZIOLOGICE ALE ACIZILOR BILIARI

Funcțiile exercitate de acizii biliari în organism pot fi astfel rezumate: efecte asupra secreției biliare, respectiv asupra formării fluxului biliar apos; rol în absorbția lipidelor și în general în metabolismul lipidic; efecte asupra funcției colonului. Pentru a înțelege funcția acizilor biliari reamintim că aceste substanțe dotate într-un plan cu grupări polare hidrofile (oxidrili în inelul steroidic și grupare acidă în lanțul lateral) iar într-un alt plan prevăzute cu grupări hidrofobe (CH_3 și CH_2) se comportă ca niște adevărați detergenți, putînd forma complexe solubile micelare cu diverși compuși care altfel ar fi insolubili în apă (de exemplu, trigliceride și colesterol). De notat că, la o anumită concentrație critică și la o anumită temperatură, acizii biliari formează agregate polimoleculare, respectiv micelii, incluzînd 20—24 molecule în care grupările hidrofobe se orientează spre interiorul miceliului iar grupările hidrofile spre exterior (vezi fig. 5.7.).

V.3.6.1. ACIZII BILIARI ȘI FLUXUL BILIAR APOS

Bila conține o gamă largă de substanțe organice și bineînțeles săruri anorganice. Alături de pigmenții biliari și acizii biliari se mai găsesc cantități importante de colesterol și fosfolipide precum și mici cantități de proteine (de exemplu, mucoproteine și fosfatază alcalină). Bila reprezintă și o cale de eliminare pentru unii metaboliți ai hormonilor steroizi și tiroidieni, pentru o serie de medicamente precum și pentru diverse alte substanțe chimice ingerate (conservanți, ciclamați etc.).

Menținerea în suspensie a tuturor acestor substanțe și asigurarea curgerii lor prin arborele biliar este condiționată de formarea unui flux biliar apos. De fapt, apa reprezintă 97% din bila hepatică și 82% din bila concentrată în vezicula biliară. Este important de precizat că deplasarea apei din capilarele sanguine spre canaliculele biliare se face independent de presiunea hidrostatică, astfel încît bila continuă să se formeze și să curgă prin canaliculele biliare chiar și atunci cînd presiunea din canalul coledoc este mai mare decît în capilarele sinusoide care irigă ficatul. Ca urmare, în condiții fiziologice, fluxul biliar apos se formează mai ales prin atragerea apei în canaliculele biliare de către o presiune osmotică ridicată. Avîndu-se în vedere corelația strictă între secreția de acizi biliari și volumul secreției biliare, se poate vorbi de un *flux biliar dependent de acizii biliari.*

Reglarea presiunii osmotice în canaliculele biliare și implicit a fluxului biliar apos de către acizii biliari este în bună măsură dependentă de formarea unor complexe macromoleculare denumite micelii care includ, alături de acizii biliari, colesterol și fosfolipide. Reamintim că în timp ce greutatea moleculară a acizilor biliari (de exemplu acid chenodeoxicolic) este de 472 daltoni, dimensiunile particulelor micelare pot ajunge la 11.000—75.000 daltoni (19). Este evident că activitatea osmotică, care depinde de numărul de particule, scade pe măsură ce acizii biliari formează micelii mai voluminoase și, în acest fel, se reglează și respectiv limitează fluxul apos în canaliculele biliare.

În urma depleţiei rezervorului de acizi biliari, curgerea bilei diminuă dar nu încetează cu desăvîrşire. Acest fenomen sugerează existenţa unei *fracţiuni a fluxului biliar independentă de acizii biliari* (vezi fig. 5.6). Deşi mecanismul intim de formare al acestei fracţiuni nu este pe deplin elucidat, există dovezi cu privire la importanţa transportului activ de sodiu în canaliculele biliare. Ca şi în alte ţesuturi, transportul de sodiu este activat de ATP-aza Na/K dependentă, iar administrarea de bicarbonat creşte fluxul biliar apos.

Dat fiind că secreţia biliară este stimulată de teofilină, un inhibitor al fosfodiesterazei, s-a emis ipoteza că acumularea intracelulară de 3-5-AMP ciclic ar reprezenta un stimul al fluxului biliar. S-a mai arătat că administrarea de fenobarbital, un bine cunoscut agent inductor de enzime microsomale, produce o creştere a secreţiei biliare (19).

V.3.6.2. ACIZII BILIARI ŞI METABOLISMUL LIPIDELOR

Metabolismul acizilor biliari interferă cu cel al lipoizilor la mai multe nivele şi sub diferite aspecte.

1) Acizii biliari facilitează emulsionarea trigliceridelor şi potenţează hidroliza acestora sub acţiunea lipazei pancreatice.

2) Acizii biliari solubilizează produşii de lipoliză şi formează împreună cu aceştia şi cu alţi lipoizi insolubili în apă micelii, care sînt preluate apoi la nivelul suprafeţei microvilozitare a celulelor epiteliale ale jejunului. Cercetări din ultimii ani sugerează că nu se produce absorbţia miceliilor intacte, acizii biliari servind doar ca vehicul de transport al produşilor de lipoliză. Desfăcuţi din micelii, acizii biliari se reabsorb apoi la nivelul ileonului.

3) În timp ce o anumită fracţiune a produşilor de lipoliză a trigliceridelor se poate absorbi şi în lipsa acizilor biliari, absorbţia vitaminelor liposolubile şi a colesterolului nu poate avea loc în lipsa solubilizării micelare asigurată de acizii biliari.

4) Acizii biliari reprezintă, pe de altă parte, principala cale de eliminare a colesterolului din organism. De fapt, din cele aproximativ 1—2 g de colesterol, care se elimină zilnic din organism, mai bine de o treime se catabolizează pe calea formării de acizi biliari.

5) Acizii biliari reabsorbiţi exercită un feed-back negativ asupra propriei lor sinteze pe seama colesterolului şi reduc deci procesul de transformare a colesterolului în acizi biliari. Stimulînd însă secreţia biliară (grăsimi nesaturate ca de exemplu oleul de porumb, ceaiuri colagoge şi coleretice) şi limitînd reabsorbţia acizilor biliari secundari printr-o dietă bogată în fibre vegetale, care fixează aceşti acizi biliari şi totodată accelerează tranzitul intestinal, amintitul efect de feed-back negativ este redus iar eliminările de colesterol sub formă de acizi biliari se accentuează. De notat că acidul deoxicolic, rezultat din dehidroxilarea în intestin a acidului colic, exercită un puternic efect de inhibare selectivă a sintezei de acid chenodeoxicolic în ficat. Efectul hipocolesterolemiant al colestiraminei şi al drenajului biliar se explică tocmai prin limitarea circuitului enterohepatic al acizilor biliari.



Fig. 5.7. Structura miceliilor din bilă. Colesterolul insolubil în apă este menţinut în suspensie de un strat protector de acizi biliari şi fosfolipide bogate în grupări polare (A). În cazul unei creşteri a proporţiei de colesterol faţă de cea de acizi biliari şi de fosfolipide (B), există tendinţa precipitării colesterolului sub formă de cristale (C) şi implicit de formare a calculilor biliari.

6) Acizii biliari reabsorbiţi reprimă nu numai colesterol 7 α-hidroxilaza şi producţia de acizi biliari pe seama colesterolului dar şi HMG-CoA reductaza hepatică şi implicit sinteza de colesterol (vezi fig. 5.5). Ca urmare, efectul hipocolesterolemiant al întreruperii circuitului enterohepatic al acizilor biliari este în parte contracarat de o dereprimare a sintezei de colesterol.

7) Acizii biliari menţin în soluţie micelară colesterolul din bilă, iar scăderea proporţiei de acizi biliari din bilă creează condiţii favorabile pentru precipitarea colesterolului şi formarea de calculi biliari (vezi fig. 5.7).

V.3.6.3. EFECTE ASUPRA FUNCŢIEI COLONULUI

Acizii biliari limitează reabsorbţia apei şi electroliţilor la nivelul mucoasei colonului şi stimulează motilitatea colonului. Prin aceste efecte, acizii biliari pot fi consideraţi ca adevărate laxative fiziologice. Excesul de acizi biliari dehidroxilaţi şi deconjugaţi poate chiar stimula secreţia de apă şi electroliţi la nivelul colonului, determinînd diareea apoasă. O astfel de situaţie, cauzată de o reabsorbţie deficitară a acizilor biliari la nivelul ileonului, poate fi tratată cu colestiramină, care fixează acizii biliari (14, 22).

V.4. ACIZII BILIARI ÎN PATOLOGIE

Perturbarea metabolismului acizilor biliari poate fi incriminată în producerea unor importante manifestări patologice în diverse boli iar dozările de acizi biliari pot avea uneori o deosebită valoarea diagnostică. Principalele anomalii ale economiei acizilor biliari cu repercusiuni în

Tabelul 5.6

Valori normale ale acizilor biliari în plasmă, bilă și materiile fecale. De notat că valorile din plasmă sînt date în μmoli/l, pe cînd la alte produse în mmoli.

	Limite	Valori medii	Observații
Plasmă	0–6 μmoli/l	1,6 μmoli/l	acid colic 35% acid chenodeoxicolic 43% acid deoxicolic 22%
Bilă în duoden	4,1–30 mmol/l	14 mmol/l	obținută din duoden după un prînz de probă
Materii fecale	4,1–1,2 mmol/24h	—	predomină acidul deoxicolic și litocolic

patologie pot fi clasificate în două mari categorii: 1) Anomalii caracterizate prin deficitul de acizi biliari, respectiv prin scăderea marcată a rezervorului; 2) Efecte toxice exercitate de acizii biliari aflați la „locul nepotrivit", adică în afara circuitului enterohepatic. Pentru a permite interpretarea variațiilor patologice în economia acizilor biliari redăm în tabelul 5.6 valorile normale ale acestor compuși în plasmă, bilă, sucul duodenal și fecale.

V.4.1. DEFICITUL DE ACIZI BILIARI

Scăderea rezervorului de acizi biliari poate surveni fie în caz de întrerupere a circuitului enterohepatic al acizilor biliari, în speță, de o perturbare severă a reabsorbției lor din intestin, fie ca urmare a unei alterări severe a sintezei lor, ca de exemplu în cazurile de ciroză hepatică decompensată.

Întrucît reabsorbția acizilor biliari are loc la nivelul ileonului printr-un mecanism biologic activ, *bolile ileonului*, însoțite de atrofia mucoasei precum și rezecțiile de ileon pot duce la importante pierderi de acizi biliari cu materiile fecale.

Popularea microbiană a intestinului subțire constituie o altă cauză importantă a deficitului de acizi biliari. O astfel de situație survine într-o varietate de stări patologice (gastrojejunostomii, diverticuloze, stricturi intestinale, fistule și chiar perturbarea funcțională a motilității, ca de exemplu după vagotomie) și realizează așa-zisul sindrom de ansă oarbă, cunoscut și sub denumirile de sindrom de ansă stagnantă sau sindrom de stază intestinală segmentară. Flora intestinală din intestinul subțire contaminat acționează asupra acizilor biliari accelerînd deconjugarea și dehidroxilarea lor și producînd mari cantități de acid deoxicolic și litocolic neconjugați care se pierd cu materiile fecale. Deși acizii biliari suferă un proces de dehidroxilare, procentul de acizi biliari dihidroxilați

din lumenul intestinal este mai scăzut decît al celor trihidroxilaţi, deoarece în condiţiile unei mucoase intestinale lezate, acizii dihidroxilaţi se reabsorb mai uşor prin difuziune pasivă. În plus, reabsorbţia acidului deoxicolic format în exces reprimă sinteza de acid chenodeoxicolic în hepatocite, fără a reduce în aceeaşi măsură producţia de acid colic.

Dacă pierderile de acizi biliari depăşesc o anumită limită, accelerarea compensatorie a sintezei hepatice de acizi biliari nu mai este capabilă să refacă aceste pierderi, astfel încît se ajunge la o diminuare progresivă a rezervelor de acizi biliari (vezi fig. 5.8).

Fistulele biliare şi administrarea prelungită a sechestranţilor de acizi biliari (de exemplu, colestiramină) pot duce, de asemenea, la scăderea rezervorului de acizi biliari.

Avîndu-se în vedere că ficatul constituie unicul organ care sintetizează acizii biliari apare firesc ca, în caz de insuficienţă hepatică cronică, de exemplu într-o ciroză hepatică decompensată funcţional, să se ajungă la o depleţie în acizi biliari. Deficiul de acizi biliari poate fi bănuit în special la bolnavii cu ciroză hepatică care prezintă steatoree.

Confirmarea prin *examinări de laborator a deficitului de acizi biliari* întîmpină dificultăţi datorită limitelor extrem de largi de variaţie a concentraţiei acestor compuşi în sucul duodenal, chiar şi în condiţii fiziologice (vezi tabel 5.6). Se consideră însă că o concentraţie a acizilor biliari sub 4 mmol/l în sucul duodenal, recoltat după stimularea secreţiei biliare cu un prînz bogat în grăsimi, atrage atenţia asupra unui astfel de deficit. Precizarea diagnosticului de malabsorbţie a acizilor biliari se poate realiza prin testul cu ^{14}C colilglicină (acid glicocolic marcat cu carbon radioactiv). Astfel, dacă după administrarea a 10 μCi din acidul biliar marcat, radioactivitatea materiilor fecale recoltate pe timp de 24 ore, depăşeşte 8% din doza administrată, se poate afirma existenţa

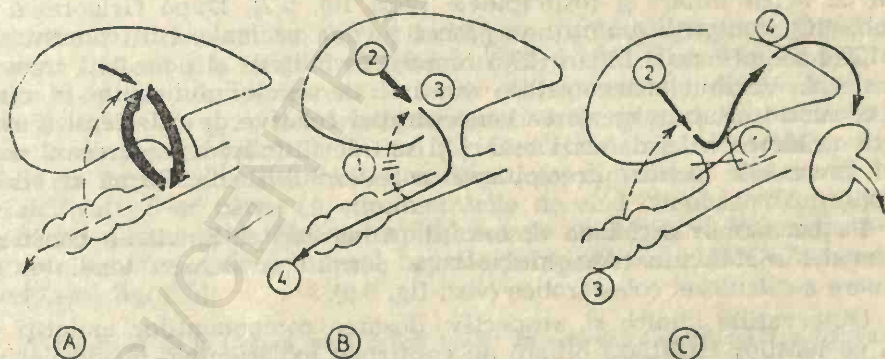


Fig. 5.8. Reprezentare schematică a unor anomalii în economia acizilor biliari. A. circuit enterohepatic normal (vezi pag. 276 şi fig. 5.3). B. Perturbarea absorbţiei intestinale a acizilor biliari (1), are drept urmare o accelerare a sintezei (2) care însă nu poate compensa pierderile masive şi implicit nu poate preveni scăderea capitalului de acizi biliari (3). Ca urmare survine steatorea iar acizii biliari neabsorbiţi în ileon şi ajunşi în colon determină o diaree apoasă (4). C. În caz de colestază, curgerea bilei în intestin este mult limitată (1) astfel încît conţinutul de acizi biliari din intestin şi implicit reabsorbţia lor în circulaţia portală scade dereprimîndu-se sinteza .(2) Perturbarea consecutivă a digestiei şi absorbţiei lipidelor duce la steatoree (3) iar acizii biliari produşi în ficat şi nesecretaţi în bilă trec în sînge (4) şi se elimină prin urină.

unei perturbări a procesului de reabsorbție intestinală a acizilor biliari (18, 22).

Consecințele deficitului de acizi biliari sînt reprezentate, în primul rînd, de perturbări în digestia și absorbția lipidelor și steatoree consecutivă (fig. 5.8). Pe de altă parte, acizii biliari neabsorbiți în ileon și ajunși în colon exercită un efect osmotic și excită peristaltismul producînd diarei apoase. În ciuda acestor fenomene, absorbția oxalaților la nivelul colonului pare a fi stimulată în astfel de condiții și, în multe cazuri de malabsorbție a acizilor biliari prin mucoasa ileonului, se ajunge la hiperoxalurie și adeseori la formarea de calculi urinari. Pe de altă parte, proliferarea microbiană în intestinul subțire și malabsorbția favorizează procesul de putrefacție, cu formarea de indol și scatol, care se elimină prin urină sub formă de indican, detectabil prin reacție Obermayer.

Există indicii după care chiar și în deficitele minore ale rezervorului de acizi biliari, care nu evoluează cu steatoree, se ajunge la o modificare în compoziția bilei, în sensul scăderii capacității acesteia de a menține în suspensie colesterol, favorizîndu-se astfel dezvoltarea litiazei biliare.

V.4.2. ACIZII BILIARI ȘI LITIAZA BILIARĂ

Majoritatea calculilor biliari care survin la populația societăților industrializate sînt alcătuiți din colesterol. Patogeneza litiazei biliare colesterolice apare așadar ca o anomalie a mecanismelor care mențin în soluție colesterolul în mediul apos al bilei. Așa cum s-a menționat în prealabil, colesterolul este menținut în soluție prin formarea de micelii cu acizii biliari și fosfolipidele (vezi fig. 5.7). După Grigorescu și colab. (13), compușii amintiți se găsesc în *bila veziculară* în concentrații de 137,4 mmol/l acizi biliari, 29,5 mmol/l fosfolipide și doar 11,1 mmol/l colesterol. Variind concentrațiile relative ale acestor substanțe *in vitro* s-a constatat că, prin creșterea concentrației relative de colesterol și respectiv scăderea celei de acizi biliari și/sau de fosfolipide, se creează condiții favorabile pentru precipitarea colesterolului sub formă de cristale (2).

Pe baza unor astfel de observații, Admirand și Small au construit un model matematic triunghiular care permite evaluarea tendinței de formare a calculozei colesterolice (vezi fig. 5.9).

Observațiile clinice și, respectiv, dozarea componenților amintiți în bila pacienților cu litiază biliară au confirmat experiențele *in vitro* și au demonstrat că bila acestor bolnavi este suprasaturată în colesterol și deci litogenică. Studii cu acizii biliari marcați au mai arătat că bolnavii cu litiază biliară prezintă un rezervor diminuat de acizi biliari, secreția biliară fiind compensată de un număr crescut de circuite enterohepatice.

S-a mai observat că incidența litiazei biliare este evident mai crescută la bolnavii cu disfuncții ale ileonului, la care pierderile cronice de acizi biliari duc cu timpul la scăderea rezervorului de acizi biliari (22). S-ar părea deci că reducerea capitalului de acizi biliari constituie o verigă

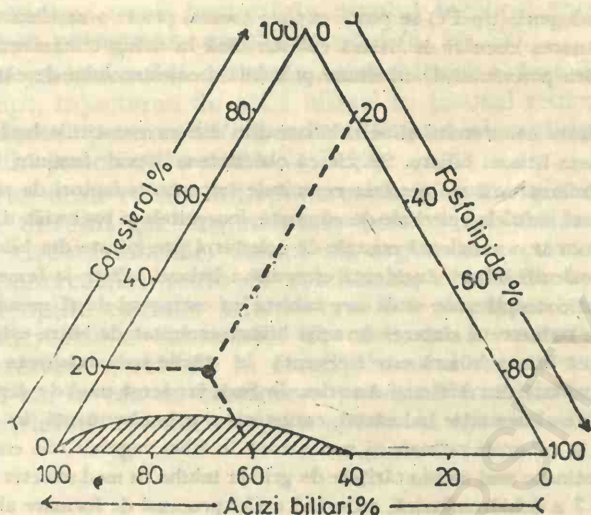


Fig. 5.9. Utilizarea diagramei de coordonate triunghiulare pentru reprezentarea conţinutului de colesterol, fosfolipide şi acizi biliari din bilă. Concentraţia fiecărui component în mmoli/l este exprimată ca un procent din total (Total=mmoli acizi biliari + mmoli colesterol + mmoli fosfolipide). Zona haşurată de la baza triunghiului reprezintă proporţii ale amestecului în care colesterolul este menţinut într-o soluţie micelară clară. Punctul obţinut în codiţiile unei concentraţii procentuale de 20% colesterol, 20% fosfolipide şi 60% acizi biliari va cădea în afara zonei proporţiilor optime. Într-o astfel de situaţie, colesterolul are tendinţa de a ieşi din soluţie formînd cristale şi favorizînd apariţia calculilor biliari (după Admirand şi Small).

importantă în dezvoltarea unei bile litogene, suprasaturată în colesterol. Această ipoteză şi-a găsit o strălucită confirmare în practica clinică, dovedindu-se că administrarea de acid chenodeoxicolic (Chenofalk[R]), în doze de 0,75—1,5 g/zi, şi mărirea consecutivă a capitalului de acizi biliari duce la dizolvarea calculilor biliari (3). Rezultatele sînt deosebit de favorabile în cazul calculilor biliari multipli, de dimensiuni reduse şi încă necalcificaţi. S-ar părea că administrările de acid chenodeoxicolic acţionează nu numai prin mărirea capitalului de acizi biliari, dar şi prin reducerea producţiei de colesterol hepatic prin inhibarea HMG-CoA-reductazei (vezi fig. 5.5).

Pornindu-se de la ipoteza unui deficit relativ în activitatea colesterol 7 α hidroxilazei (producţia relativ insuficientă de acizi biliari), s-a încercat o inducere a enzimei amintite prin administrarea de fenobarbital. Rezultatele au fost însă neconcludente şi se pare că fenobarbitalul induce atît 7 α hidroxilaza şi, respectiv producerea de acizi biliari, cît şi HMG-CoA reductaza şi implicit sinteza de colesterol.

De altfel suprasaturarea cu colesterol a bilei poate surveni nu numai din cauza unui deficit relativ de acizi biliari în bilă dar şi printr-o eliminare crescută de colesterol în bilă, astfel încît se depăşeşte capacitatea de solubilizare a acestui lipoid, chiar în condiţiile unui rezervor normal de acizi biliari. Frecvenţa relativ crescută a litiazei biliare la obezi şi la subiecţii cu hi-

pertrigliceridemie endogenă (tip IV) se poate explica tocmai printr-o accelerare a sintezei de colesterol iar accentuarea riscului de litiază colesterolică în urma tratamentului cu clofibrat se datorește favorizării procesului de eliminare prin bilă a colesterolului de către terapia amintită.

Dezechilibrul între colesterolul și acizi biliari din bilă nu constituie însă singurul factor implicat în patogeneza litiazei biliare. Se știe că obezitatea, sexul feminin, hipotonia vezicii biliare și procesele inflamatorii ale acesteia constituie importanți factori de risc pentru apariția litiazei, iar mucusul, celulele epiteliale descuamate, leucocitele și bacteriile din bilă pot forma nucleele în jurul cărora se acumulează cristale de colesterol precipitate din bila litogenă și care formează progresiv calculii biliari. Incidența crescută a litiazei biliare la femei și mai ales la cele care folosesc anticoncepționale orale sau tablete cu estrogeni după menopauză pare a se datora unui efect de reducere a sintezei de acizi biliari exercitat de către estrogeni (14).

De menționat că litiaza biliară este frecventă în țările industrializate și foarte rară în țările în curs de dezvoltare din Africa și America de Sud, iar acest mod de distribuție pare a fi în legătură cu tipul de alimentație industrial, caracterizat prin abundență în calorii furnizate mai ales de grăsimi și zaharuri rafinate și mai săracă în fibre vegetale. Se consideră că astfel de fibre vegetale conținute mai ales în tărîțele de grîu ar inhiba în mod selectiv flora microbiană dotată cu activitate 7 α dehidroxilazică, reducînd astfel procesul de formare al acizilor biliari secundari iar, pe de altă parte, prin fixarea acizilor biliari secundari (deoxicolic și litocolic) pe fibrele vegetale le reduce absorbția și implicit efectul lor de supresie a sintezei de acid chenodeoxicolic. Prin urmare, deși fibrele vegetale favorizează eliminarea acizilor biliari, ele nu reduc rezervorul de acizi biliari întrucît sinteza acestora pe seama colesterolului este stimulată.

V.4.3. TOXICITATEA ACIZILOR BILIARI

Există dovezi că aceste substanțe tensioactive exercită efecte nocive asupra țesuturilor neadaptate la prezența lor. Se incriminează astfel de efecte toxice ale acizilor biliari în patogeneza gastritelor, a ulcerului gastric, a diareilor din disfuncția ileonului, a pancreatitelor și a unor manifestări apărute în cursul colestazei. De menționat că acizii biliari dihidroxilați și mai liposolubili exercită efecte toxice mai puternice asupra membranelor celulare decît acizii biliari trihidroxilați. Acidul litocolic este, de asemenea, toxic, dacă eliminarea lui prin fecale este încetinită.

Mucoasa gastrică este bine adaptată menținerii unei soluții cu pH acid împotriva gradientului de concentrație, împiedicînd retrodifuziunea ionilor H^+, dar este susceptibilă la efectul detergent al acizilor biliari care exercită un efect dizolvant asupra membranelor lipoproteice ale celulelor gastrice și alterează proprietățile fizice ale mucusului gastric. S-a sugerat astfel că regurgitarea de bilă și de acizi biliari (reflux duodeno-gastric) ar putea juca un rol patogen în dezvoltarea gastritei și ulcerului gastric și, de fapt, conținutul în acizi biliari al sucului gastric este mai crescut la bolnavii cu ulcer gastric decît la subiecții de control, denotînd intervenția frecventă a refluxului duodenogastric.

Iritarea mucoasei colonului de către acizii biliari și producerea unor diarei apoase în cursul malabsorbției acestor detergenți biologici, la nivelul ileonului, a fost amintită anterior (vezi pag. 286). Există și unele observații după care iritația cronică a mucoasei tractului gastrointestinal de către acizii biliari și mai ales de către unii metaboliți ai lor, dehidro-

genați, sub acțiunea unor bacterii la nivelul inelului steroidic, ar putea fi incriminată în patogeneza carcinogenezei (8, 14, 22).

Afectarea pancreasului de către acizii biliari a fost dovedită experimental. De fapt, injectarea de acizi biliari în țesutul pancreatic sau instilarea lor în ductul pancreatic reproduce leziuni ale celulelor acinoase similare celor din pancreatita acută (5, 7, 12).

Producerea unui reflux biliopancreatic în patologia clinică este însă mai greu de dovedit iar argumentele pentru un astfel de proces sînt mai degrabă circumstanțiale. Astfel de argumente cum ar fi: asocierea frecventă a pancreatitei acute cu colelitiaza, existența în numeroase cazuri a unei ampule comune biliopancreatice și evidențierea unui reflux în ductul pancreatic a substanței de contrast în cursul unei colangiografii preoperatorii, efectuate în condițiile unui regim crescut de presiune, sugerează că, în caz de creștere a presiunii în căile biliare (obstruare prin calcul, stricturi coledociene sau spasm la nivelul sfincterului Oddi),

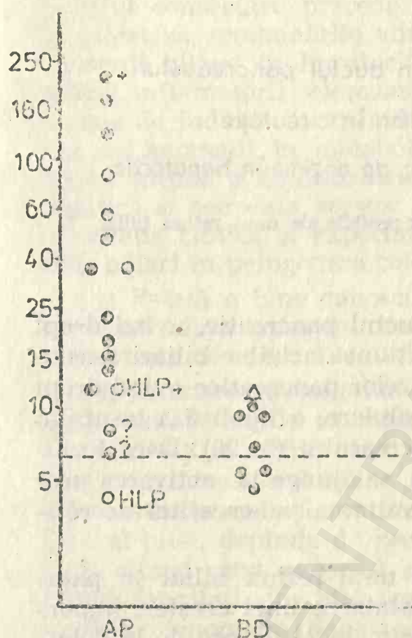


Fig. 5.10. Nivelul acizilor biliari serici (μmoli/l reprezentare logaritmică) la pacienți cu pancreatită acută (AP) și la bolnavi cu afecțiuni biliare acute fără afectare decelabilă a pancreasului (amilazemia și amilazuria normale). (BD) Toate cazurile au fost investigate în primele 24 de ore de la debutul fenomenelor acute. HLP — pacienți hipertrigliceridemici (?) etiologie neprecizată; + evoluție letală; Δ colică biliară la un pacient cu ciroză hepatică. Linia orizontală întreruptă indică limita superioară a normalului pentru acizii biliari serici.

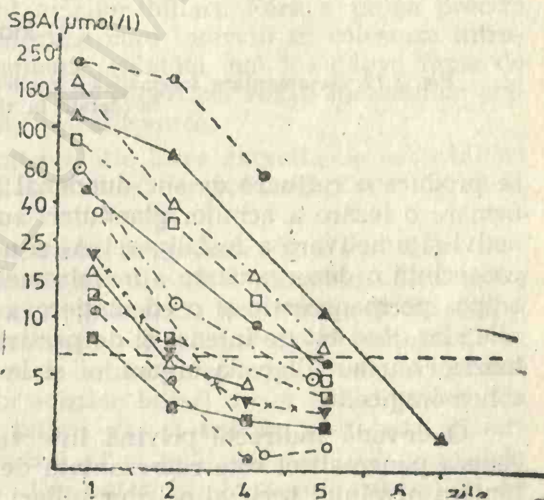


Fig. 5.11. Evoluția acizilor biliari serici la 12 bolnavi cu pancreatită acută, care au putut fi investigați dinamic. Pe abscisă: timpul în zile; pe ordonată: concentrația acizilor biliari în ser (μmoli/l — reprezentare logaritmică); + pacient cu colecistită cangrenoasă, pancreatită acută și evoluție letală. Linia orizontală întreruptă indică limita superioară a normalului pentru acizii biliari serici.

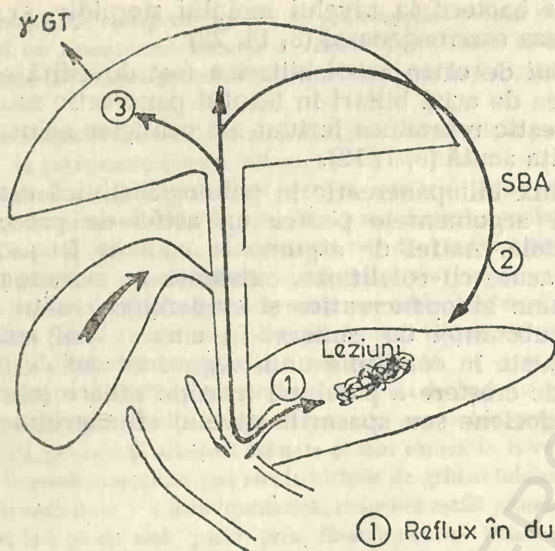


Fig. 5.12. Reprezentare schematică a implicațiilor posibile ale unui reflux biliar (detalii în text).

se produce o refluare de suc duodenal în ductul pancreatic, avînd drept urmare o lezare a acinilor glandulari sub acțiunea acizilor biliari tensioactivi și o activare a fosfolipazei A_2 și a lipazelor pancreatice avînd drept consecință o dezorganizare a membranelor celulare, o lipoliză a țesutului adipos peripancreatic și o edemațiere a pancreasului (5, 20). Dacă leziunile sînt deosebit de intense și de persistente, se ajunge la activarea proteazelor cu autodigestia organului și la dezvoltarea pancreatitei necroticohemoragice.

O dovadă indirectă privind intervenția unui reflux biliar în patogeneza pancreatitei este reprezentată de constatarea unei creșteri importante a nivelului seric al acizilor biliari în primele 24 de ore de la debutul fenomenelor acute ale unei pancreatite (10). Întrucît nivelul lor seric se normalizează în cursul următoarelor 48—72 de ore, este puțin probabil ca o astfel de creștere tranzitorie a acestor detergenți biologici în circulația sistemică și implicit în sîngele care irigă pancreasul să producă leziuni ale acinilor. Creșterea bruscă și importantă a acizilor biliari serici în cursul unei pancreatite acute de origine biliară atrage însă atenția asupra producerii unui reflux biliopancreatic cu importanță patogenică certă (fig. 5.10—5.12). Pe de altă parte, există indicii după care un nivel crescut de durată al acizilor biliari în sînge, așa cum survine în ciroza biliară, ar putea contribui la instalarea fibrozei pancreatice (10).

V.4.4. ACIZII BILIARI ȘI COLESTAZA

Așa cum s-a mai arătat (vezi pag. 265), colestaza poate fi definită ca o perturbare în procesul de formare și curgere a bilei și evoluează cu o diminuare a debitului biliar. Pentru problemele tratate în acest capitol, este important de arătat că orice colestază evoluează cu o creștere importantă a nivelului seric al acizilor biliari care pot depăși 100 μmoli/l.

În *colestazele extrahepatice* cauzate de o obstrucție mecanică a canalului coledoc creșterea acizilor biliari în ser este o simplă consecință a întreruperii fluxului biliar și se asociază de la bun început cu retenția altor compuși eliminați în mod obișnuit cu bila (colesterol, fosfolipide, bilirubină conjugată) și, în consecință, evoluează cu toate caracterele icterului mecanic.

Colestazele intrahepatice ridică însă probleme de patogeneză deosebit de complexe, iar în perioadele de debut, creșterea acizilor biliari și pruritul consecutiv precede apariția icterului. Deși în stadiile avansate de colestază, examinările anatomopatologice evidențiază acumularea de pigmenți biliari în hepatocite, „trombi biliari în canalicule" precum și leziuni inflamatorii sclerozante ale ducturilor biliare intrahepatice, există o serie de indicii că, în multe cazuri, procesul patologic este inițiat tocmai de anomalii în metabolismul acizilor biliari. Fără a putea preciza natura intimă a mecanismelor patogene care intervin în colestaza intrahepatică și secvența acestor mecanisme, relatăm mai jos cîteva fapte de observație clinică și experimentală care sugerează rolul anomaliilor acizilor biliari în patogeneza colestazei intrahepatice.

1) Există o bine cunoscută interrelație între excreția de acizi biliari și fluxul biliar apos în canaliculele biliare iar scăderea fluxului biliar se însoțește de creșteri ale acizilor biliari în ser.

2) Infuzarea șobolanilor cu cantități importante de acizi biliari monohidroxilați, ca de exemplu, acidul litocolic (3 α monohidroxicolanoic) sau acid 3-β monohidroxi-5 colenoic (care poate proveni și el din colesterol), oprește fluxul biliar. De notat că acizii biliari monohidroxilați au o solubilitate redusă iar menținerea lor în soluție micelară, în mediul apos al bilei, depinde de prezența acizilor biliari di- și trihidroxilați. De fapt, atunci cînd raportul acizi biliari di- și trihidroxilați/acizi biliari monohidroxilați din bilă scade sub 1,33 și mai ales sub 0,7, animalele dezvoltă fenomene de colestază. De notat că, în serul bolnavilor cu colestază intrahepatică, acidul litocolic poate crește la valori medii de 2 μmoli/l, în timp ce în serul subiecților sănătoși sau chiar în cazurile de hepatită fără componentă colestatică, acest acid biliar monohidroxilat nu poate fi decelat (4). Se poate bănui deci că o perturbare în procesul de hidroxilare a acizilor biliari și acumularea de compuși monohidroxilați perturbă mecanismele de formare a fluxului biliar apos.

3) Colestaza poate fi provocată animalelor de experiență prin administrarea de α-naftilizotiocianat (ANIT), o substanță care diminuă activitatea enzimelor microsomale.

Reamintim că la nivelul microsomilor are loc procesul de hidroxilare a acizilor biliari în cadrul unor reacții în care intervine citocromul

P_{450}, precum și procesele de conjugare cu glicocolul și taurina în cadrul unor mecanisme dependente de ATP și coenzima A.

Este posibil ca și fenomenele de colestază, observate în patologia clinică după administrarea unor medicamente, ca de exemplu a fenotiazinelor, să se datoreze perturbării proceselor semnalate și deficitului de formare a miceliilor.

4) Administrarea de etinilestradiol determină, la șobolan, o reducere marcată a fluxului biliar apos și implicit fenomene de colestază. S-a putut ulterior preciza că acest efect se datorește unei creșteri a permeabilității canaliculelor biliare, sub acțiunea estrogenilor de sinteză, care permite difuzarea acizilor biliari din canaliculi spre interstiții. Se reduce astfel concentrația de acizi biliari din canaliculi și, ca urmare, scade efectul lor osmotic de atragere a apei în canalicul și deci de formare a fluxului biliar. Aceste constatări își găsesc un corespondent în colestaza care survine la unele femei în ultimul trimestru de graviditate sau după folosirea de anticoncepționale orale sau de 17-metiltestosteron. Întrucît fenomenele de colestază apar doar la un mic procent de femei care utilizează substanțele amintite, se bănuiește o susceptibilitate particulară condiționată genetic.

5) Colestaza intrahepatică progresivă sau *boala lui Byler* furnizează un alt exemplu de colestază funcțională consecutivă unei anomalii în economia acizilor biliari. Această boală cu caracter genetic care debutează în prima copilărie și evoluează spre deces înaintea vîrstei de 8 ani, se caracterizează prin steatoree, hepatomegalie, hipotrofie staturală, rahitism, creșterea nivelului seric al acizilor biliari și prurit intens. Mecanismul patogenic constă dintr-un defect sever de transport al acizilor biliari prin membrana canaliculelor biliare, respectiv din deficitul genetic de sinteză a unei proteine transportoare care asigură transferul acizilor biliari din hepatocite în canaliculele biliare.

6) La mecanismele amintite se pot adăuga procese inflamatorii care duc la compresiunea ducturilor biliare precum și lezarea prin mecanism autoimun a acestor ducturi care se fibrozează.

În lumina datelor prezentate se poate sugera că anomalii în hidroxilarea acizilor biliari și în transportul lor din hepatocite spre ducturile biliare sau difuzarea acestor detergenți biologici din canaliculi spre hepatocite sau în interstițiu au drept urmare o scădere a fluxului biliar apos și o încetinire a excreției de acizi biliari a căror concentrație scade în bilă dar crește în hepatocite și în ser. Scăderea fluxului biliar apos duce la înnoroirea bilei din canaliculi unde se formează trombi biliari stagnanți și se ajunge la lezarea microvililor.

Acizii biliari tensioactivi acumulați în interstițiu dizolvă fragmente din membrana plasmatică a hepatocitelor care trece în plasmă împreună cu enzime membranale, așa cum sînt fosfataza alcalină și γ-glutamiltransferaza. Creșterea în plasmă a acestor enzime indicatoare ale colestazei se realizează însă și printr-un proces de inducere (vezi pag. 190). De altfel și sinteza unor factori ai coagulării este stimulată în cursul colestazei intrahepatice (6). Cu timpul se afectează și eliminarea bilirubinei conjugate astfel încît sindroamele colestatice, evoluînd la început doar cu creșterea nivelului seric de acizi bilari și a enzimelor indicatoare ale colestazei, ajung să prezinte icter. Totodată funcția hepatoci-

telor se alterează progresiv, iar prin înlocuirea parenchimului hepatic cu țesut fibros și dezorganizarea arhitecturii ficatului, se ajunge la aspectul de ciroză biliară (4, 9, 18).

Datele relatate cu privire la rolul posibil al anomaliilor în economia acizilor biliari, avînd drept efect reducerea fluxului biliar apos, nu acoperă decît parțial complexitatea mecanismeloe care intervin în patogeneza colestazei intrahepatice și în dezvoltarea cirozei biliare.

Recent, s-a putut demonstra că aproximativ 84% dintre bolnavii cu ciroză biliară primitivă prezintă un deficit marcat al proceselor de sulfoxidare care se repercută negativ asupra funcției antitoxice a ficatului. De fapt, reducerea producției de sulfat anorganic endogen, provenit din oxidarea cisteinei sub acțiunea cisteinoxidazei (din sistemul oxidoreductazelor microsomale cu funcții mixte) (vezi pag. 190), perturbă procesul de sulfoconjugare a unor metaboliți cu efect colestatic. S-a arătat de altfel că sulfoconjugarea acidului litocolic și a unor produși de metabolism ai estrogenilor le reduce, în mare măsură, activitatea colestatică și hepatotoxicitatea (27).

Reamintim faptul că în ciroza biliară primitivă se constată foarte frecvent anomalii imunologice cum ar fi creșterea imunoglobulinelor M (IgM), prezența în ser a anticorpilor antimitocondriali și scăderea activității *in vitro* a limfocitelor T supresoare.

Mecanismele prin care aceste anomalii ale imunității ar putea interveni în dezvoltarea cirozei biliare primitive sînt neclare și de altfel nici rolul lor patogen nu a fost încă dovedit cu certitudine (28).

V.4.5. ACIZII BILIARI CA TEST DE EXPLORARE FUNCȚIONALĂ A FICATULUI

Acest aspect a fost tratat într-un capitol anterior (vezi pag. 243). Reamintim că nivelul seric al acizilor biliari poate să crească nu numai ca urmare a colestazei dar și datorită unei insuficiențe hepatice. Fenomenul își găsește o explicație prin incapacitatea ficatului de a capta acizii biliari reabsorbiți din intestin și care trec astfel prin venele suprahepatice în circulația sistemică. Întrucît perturbarea mecanismului de mai sus este mai importantă decît reducerea capacității de sinteză a acizilor biliari în hepatocite, rezultanta este o creștere a nivelului lor seric, care pare să fie, în mare măsură, dependentă de gravitatea insuficienței hepatice (vezi fig. 5.13 și 5.14 și tabelul 5.6).

Reamintim și cu acest prilej că nivelele crescute de acizi biliari pot fi depistate mai ales după două ore de la un prînz de probă bogat în grăsimi (17).

V.4.6. ACIZI BILIARI ÎN HIPERLIPOPROTEINEMII

Așa cum s-a arătat anterior (vezi pag. 202), metabolismul acizilor biliari este strîns legat de cel al colesterolului, și, de fapt, diversele tipuri de hiperlipoproteinemie asociate cu variate anomalii în metabolismul colesterolului prezintă totodată și anumite particularități în economia acizilor biliari.

Așa de exemplu, în *hipercolesterolemia familială* (tip II-a), în care deficitul de receptori are ca urmare o încetinire a captării și catabolizării β-lipoproteinelor (vezi și pag. 53), se constată totodată și o încetinire a transformării colesterolului în acizi biliari. De fapt, sinteza de acid colic este mai scăzută decît la normali, fiind parțial compensată de o creștere a producției de

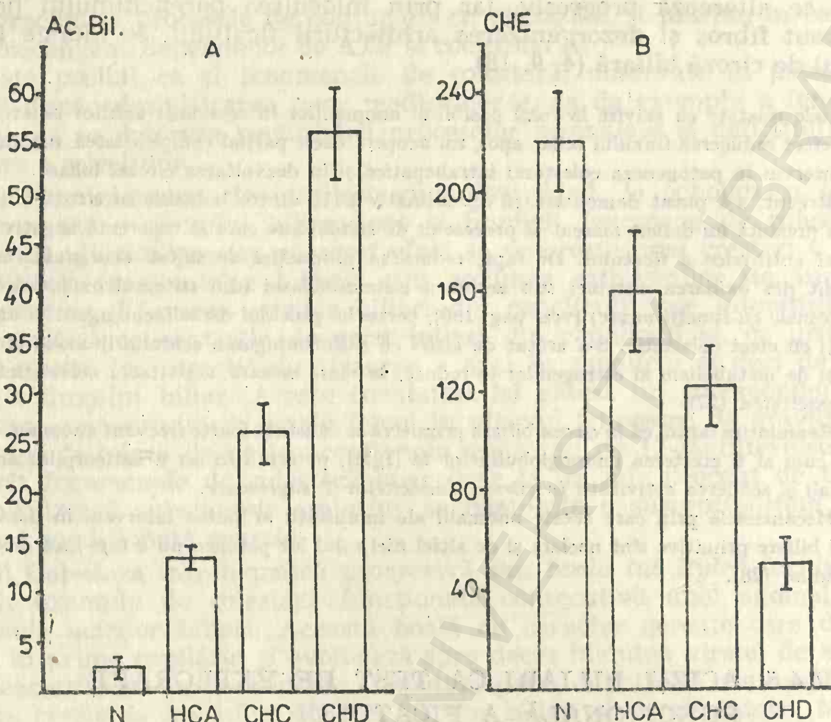


Fig. 5.13. Comportarea nivelului seric al acizilor biliari (A) în µmoli/l şi al colinesterazei serice (B) în µmoli/ml/h la subiecţi normali (N), la bolnavii cu hepatită cronică activă (HCA) a pacienţii cu ciroză hepatică compensată (CHC) şi la cei cu ciroză heptică decompensată (CHD). Se poate vedea că alterarea funcţiilor hepatice evidenţiate prin scăderea progresivă a activităţii colinesterazei serice (CHE) se însoţeşte de o creştere a nivelului seric al acizilor biliari (Ac. Bil.). La cazurile prezentînd fenomene accentuate de colestază, creşterea acizilor biliari este disproporţionat de mare faţă de alterarea funcţiilor hepatice, respectiv faţă de gradul relativ moderat de scădere a colinesterazei serice, iar nivelul factorilor coagulării, sintetizaţi de ficat, poate fi chiar crescut.

acid chenodeoxicolic. Terapia acestui tip de hiperliporproteinemie prin administrarea de cholestiramină se bazează tocmai pe întreruperea circuitului enterohepatic al acizilor biliari pe care-i fixează în intestin, dereprimîndu-se astfel colesterol 7 α-hidroxilaza şi crescînd producţia de acizi biliari pe seama colesterolului (vezi pag. 69 şi fig. 5.5).

La mulţi bolnavi cu *hiperlipoproteinemie tip IV*, evoluînd cu accelerarea proceselor de sinteză şi turnover a lipoproteinelor şi a colesterolului, se constată, totodată, şi o accelerare a sintezei de acizi biliari şi în special de acid colic. Producţia de acizi biliari se corelează cu greutatea corporală şi cu nivelul trigliceridelor serice şi are tendinţa de revenire la normal prin slăbire şi în urma tratamentului cu clofibrat. Deoarece însă producţia de colesterol şi eliminarea de colesterol în bilă sînt şi ele crescute, ne putem astfel explica atît creşterea moderată a colesterolemiei cît şi marea tendinţă la litiaza biliară a subiecţilor cu hipertrigliceridemie endogenă (9, 11).

Interrelaţia dintre metabolismul sterolilor şi cel al acizilor biliari reiese şi din studiul *xantomatozei cerebrotendinoase*. Această boală genetică, evoluînd cu fenomene neurologice şi caracterizată printr-o acumulare de steroli (colesterol şi colestanol), în ţesuturi (creier, plămîni

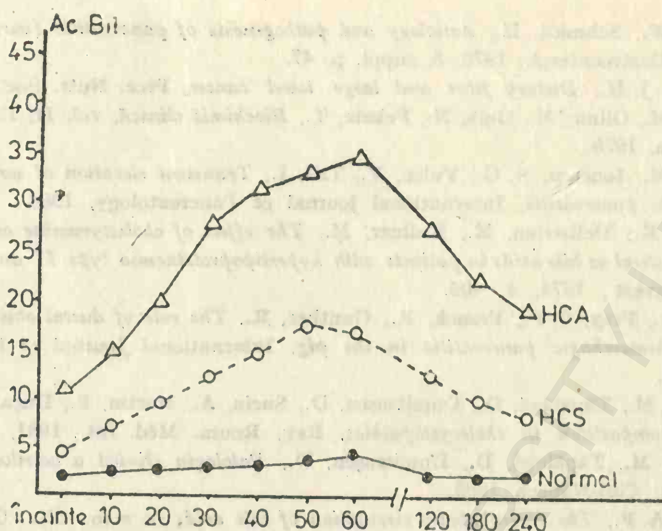


Fig. 5.14. Testul de toleranţă endogenă la acizi biliari la un subiect normal, la un pacient cu hepatită cronică stabilizată (HCS) şi la un bolnav cu hepatită cronică activă (HCA). Pe ordonată concentraţia acizilor biliari serici în μmoli/l. Acizii biliari au fost determinaţi înainte şi după un prînz bogat în grăsime. Se poate vedea că prin acest test de încărcare se accentuează anomaliile prezentate de acizii biliari serici, astfel încît se pot depista valori postprandiale crescute chiar şi la pacientul cu HCS la care nivelul bazal al acizilor biliari serici era la limita superioară a normalului; pe abscisă timpul în minute.

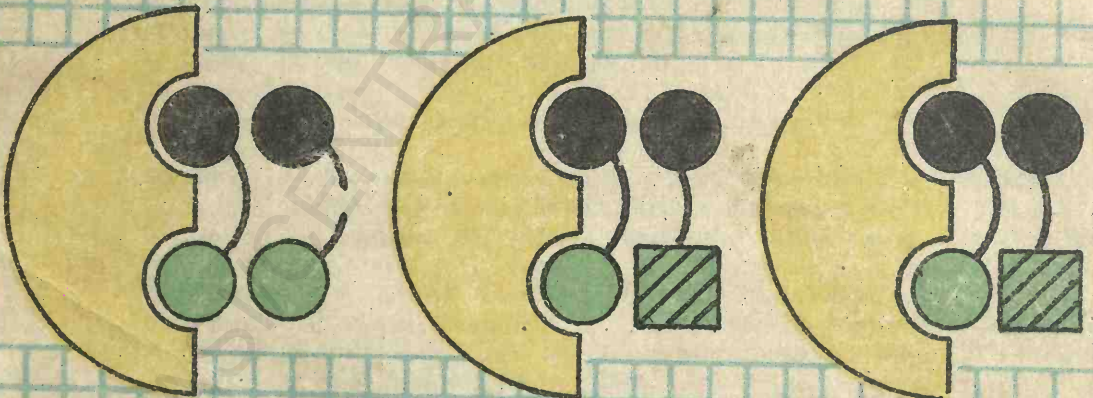
şi tendoane), se datoreşte unui deficit în sinteza de acizi biliari şi mai precis în procesul de oxidare a lanţului lateral la carbonul 26. Perturbarea sintezei acizilor biliari scoate din joc mecanismul de feed-back negativ exercitat de aceştia asupra HMG-CoA reductazei şi a sintezei de steroli. De notat că datorită marii tendinţe de depunere în ţesuturi a sterolilor, nivelul plasmatic al colesterolului nu este crescut (23).

BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

1. Accatino, L., Simon, F. R., *Identification and characterization of a bile acid receptor in the isolated liver surface membranes*, J. Clin. Invest., 1976, 57, 496.
2. Amirand, W. H., Small, D. M., *The physicochemical basis of cholesterol Gallstone formation in man*, J. Clin. Invest., 1968, 47, 1043.
3. Bell, G. D., Whitney, B., Dowling, G. R., *Gallstone dissolution in man using chemodeoxycoholic acid*, Lancet., 1972, 2, 1213.
4. Berk, P. D., Javitt, N. B., *Hyperbilirubinemia and cholestasis*, Amer. J. Med., 1978, 64, 311–326.
5. Blackstone, M. O., *Acinar cell or interstitial space: when is pancreatitis initiated?* N. Engl. J. Med., 1987, 317, 319.
6. Cederblad, C., Korsan-Bengtsen, K., Olsson, R., *Observations of increased levels of blood coagulation in cholestatic liver disease*, Scand. J. Gastroenterol., 1976, 11, 391.

7. Cretzfeld, W., Schmidt, H., *Aetiology and pathogenesis of pancreatitic (current concepts)* Scand. J. Gastroenterol., 1970, 5, suppl. p. 47.
8. Cummings, J. H., *Dietary fibre and large lowel cancer*, Proc. Nutr. Soc., 1981, 40, 7.
9. Cucuianu, M., Olinic, N., Goia, N., Fekete, T., *Biochimie clinică*, vol. II, Editura Dacia, Cluj-Napoca, 1979.
10. Cucuianu, M., Ionescu, N. G., Vulcu, V., Trif, I., *Transient elevation of serum bile acids during acute pancreatitis*, International journal of Pancreatology, 1988.
11. Einarsson, K., Hellström, K., Kallner, M., *The effect of cholestyramine on the elimination of cholesterol as bile acids in patients with hyperlipoproteinemia type II and IV*, Europ. J. Clin. Invest., 1974, 4, 405.
12. Farias, L.R., Frey, C. F., French, R., Gunther, R., *The role of ductal obstruction on the course of hemorrhagic pancreatitis in the pig*, International Journal of Pancreatology, 1986, 1, 51.
13. Grigorescu, M., Tăpalăgă, D., Dumitraşcu, D., Suciu, A., Martin, P., Duca, S., *Gallbladder lipid composition in cholecystopathies*, Rev, Roum. Méd. Int., 1981, 19, 283–288.
14. Grigorescu, M., Tăpălagă, D., Dumitraşcu, D., *Patologia clinică a acizilor biliari*, Editura Dacia, Cluj-Napoca 1983.
15. Hofmann, A. F., *The enterohepatic circulation of bile acids in man.*, Clin. Gastroenterol., 1977, 6, 3.
16. Isselbacher, K. J., *Jaundice and hepatomegaly in* Braunwald, Isselbacher, Peterdorf, Wilson Martin Fauci (Editors), *Harrison's principles of internal Medicine*, McGrow-Hill Book Company, New York, 1987, pp. 183–187.
17. Iwamura, K., *Bile acid metabolism and liver diseases*, Das Medizinische Prisma, Boehringer Ingelheim., 1982, 3.
18. Javitt, N. B., *Hyperbilirubinemic and cholestatic syndromes*, Postgraduate Medicine, 1979, 65, 120.
19. Javitt, N. B., *Hepatic bile formation*, N. Engl. J. Med., 1976, 295, 1464–1469 şi 1511–1516.
20. Kümmerle, F., Hollender, L. F., Lehnert, P., Wanke, M., *Akute Pankreatitis-interdisziplinäre Standartbestimmung*, Med. Welt, 1984, 35, 2.
21. Mattern, S., Hackenschmidt, J., Back, P., Gerok, W., *Advances in bile acid Research*, F. K. Schattauer, Stuttgart, New York, 1975.
22. Mattern, S., Gerok, W., *Pathophysiology of the enterohepatic circulation of bile acids*, Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol., 1979, 85, 125.
23. Salen, G., Shefer, S., Cheng, F., Dayal, B., Datta, A. K., Tint, G. S., *Cholic acid biosynthesis. The enzymatic defect in cerebrotendinous xanthomatosis*, J. Clin. Invest., 1979 63, 38.
24. Schmid, R., *Hyperbilirubinemia* in Stanbury, I. B., Wyngaarden I. B., Fredrickson, D S., *The metabolic basis inherited disease*, McGrow Hill, New York, 1979, 1141.
25. Tăpălagă, D., Cucuianu, M., Suciu, A., *Diagnosticul biochimic al colestazei*, Med. Int., 1978, 4, 443.
26. Wintrobe, M. M., *Clinical Hematology*, Lea-Febiger, Philadelphia, 1974.
27. Olomu, A. B., Vickers, C. R., Waring, R. H., Clemens, D., Babbs, C., Warnes T. W., Elias, E., *High incidence of poor sulfoxidation in patients with primary biliary cirrhosis*, N. Engl. J. Med., 1988, 318, 1089–1092.
28. Kaplan, M. M., *Primary biliary cirrhosis*, N. Engl. J. Med., 1987, 316, 521–528.

EDITURA
DACIA



Lei 115,-

ISBN 9773—35—0214—6